Einfluß akuter und chronischer Ethanolbehandlung auf die Lipidperoxidation in vitro und in vivo

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Thomas Hintze

aus Holzminden

1981

81 280

Einfluß akuter und chronischer Ethanolbehandlung auf die Lipidperoxidation in vitro und in vivo

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Thomas Hintze

aus Holzminden

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.1981

Dekan : Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Remmer
2. Berichterstatter : Prof. Dr. D. Mecke

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden von Januar 1977 bis Dezember 1979 am Institut für Toxikologie unter der Leitung des Institutsdirektors Professor Dr. med. H. Remmer durchgeführt.

Herrn Professor Dr. H. Remmer danke ich für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und für die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Herrn Dr. H. Frank möchte ich für seine Unterstützung und die Zusammenarbeit danken. Wertvolle Diskussionen lieferten Dr. H. Kappus, Düsseldorf und Dr. J. Filser, Mainz. Für ihre wertvolle technische Unterstützung bin ich Frau M. Müh-Zange und Herrn G. Joachim zu Dank verpflichtet.

Abstract

Hintze, Thomas:
Einfluß akuter und chronischer Ethanolbehandlung auf die Lipidperoxidation in vivo und in vitro

Bromtrichlormethan und Ethanol schädigen isolierte Rattenleberparenchymzellen.
Bromtrichlormethan und Tetrachlorkohlenstoff lösen im Gegensatz zu Ethanol und Acetaldehyd in isolierten Hepatozyten Lipidperoxidation aus. Akute und chronische Vorbehandlung der Zellspender mit Ethanol sowie Haltung mit einer Vitamin E-armen Diät verstärken die durch Bromtrichlormethan induzierte Malondialdehydentwicklung.

Die Freisetzung von Ethan und n-Pentan als Indikator für Lipidperoxidation aus der isoliert perfundierten Leber nach Bromtrichlormethan entspricht der von Ratten in vivo nach einer identischen Bromtrichlormethaninjektion. Von Labortieren in ein geschlossenes Exsikkatorsystem abgeatmete Kohlenwasserstoffe werden reinhaliert und nachfolgend durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums der Leber verstoffwechselt. Hemmung des Stoffwechsels durch Ethanol, Diethyldithiocarbamat, Tetrahydrofuran und Propandiol führt zu einer vermehrten Ansammlung endogen gebildeter Kohlenwasserstoffe im Gasraum und täuscht so eine geringe prooxidatische Wirkung dieser Substanzen vor. Chronische Ethanolbehandlung ändert das Muster der abgeatmeten Kohlenwasserstoffe bei männlichen Ratten. Es entspricht damit dem von weiblichen Tieren, das durch chronische Ethanolgabe nicht beeinflußt wird.
Auch bei der Peroxidation von Rattenlebermikrosomen mit ADP-Eisen interferiert der Stoffwechsel von n-Pentan mit der Freisetzung dieses Alkans.

Chronische Ethanolfütterung begünstigt bei Ratten die Ansiedlung methanogener Bakterien im Gastrointestinaltrakt.

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Toxikologie des Ethylalkohols	4
1.1.1.	Ethanolstoffwechsel	4
1.1.2.	Acetaldehydstoffwechsel	9
1.1.3.	Beeinflussung der Biochemie der Leber durch Ethanol und Acetaldehyd	11
1.1.4.	Leberschäden durch Ethanol	14
1.2.	Toxikologie mehrfach halogenierter Methane	16
1.3.	Lipidperoxidation	20
1.4.	Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	30
2.	Methoden	31
2.1.	Methodik der isoliert perfundierten Leber	31
2.1.1.	Präparation der Erythrozyten	32
2.1.2.	Die Perfusionsanlage	32
2.1.3.	Präparation der Leber	35
2.1.4.	Perfusion	35
2.2.	Präparation von Leberzellen	37
2.2.1.	Tiere	37
2.2.2.	Lösungen	38
2.2.3.	Isolierung der Leberzellen	39
2.2.4.	Bestimmung der Zellzahl	41
2.2.5.	Proteinbestimmung	41
2.2.6.	Bestimmung der Vitalität der Zellen	42

2.2.6.1.	Trypanblauexklusion	42
2.2.6.2.	Lactatdehydrogenase	42
2.2.6.3.	Glutamatdehydrogenase	43
2.2.6.4.	Bestimmung des Glutathiongehaltes	43
2.2.7.	Lipidperoxidation in Leberzellen	44
2.2.7.1.	Malondialdehydbestimmung	44
2.2.7.2.	Auslösung der Lipidperoxidation (Inkubationsmethode)	44
2.3.	Präparation von Rattenlebermikrosomen	46
2.3.1.	Auslösung der Lipidperoxidation in Mikrosomeninkubationen	46
2.4.	in vivo Experimente	48
2.4.1.	Tiermaterial	48
2.4.2.	Vorbehandlung der Tiere	48
2.4.3.	Exsikkatorsystem zur Kollektion der Atemgase	50
2.4.4.	Exsikkatorsystem zur Bestimmung der Aufnahme von Kohlenwasserstoffen	52
2.4.5.	Zugabe von Gasen und Gasgemischen in das Exsikkatorsystem	52
2.4.6.	Gaschromatographische Bestimmung von Kohlenwasserstoffen	53
2.4.7.	Massenspektroskopie	55

3.	Pharmakokinetische Analyse	57
3.1.	Kinetik bei den Expositionsversuchen	57
3.1.1.	Einstellung des Gleichgewichts	60
3.1.2.	Metabolismus	60
3.2.	Kinetische Analyse bei den Exhalations-experimenten	63
4.	Ergebnisse	66
4.1.	Versuche mit isolierten Parenchym-zellen aus Rattenlebern	66
4.1.1.	Auslösung der Lipidperoxidation	66
4.1.2.	Einflüsse der chronischen Behandlung mit Ethanol auf die Lipidperoxidation in Hepatozyten	74
4.1.3.	Lipidperoxidation in Hepatozyten aus Ratten mit Vitamin E-Mangel mit gleichzeitiger chronischer Ethanol-vorbehandlung	79
4.1.4.	Untersuchungen zur Vitalität der He-patozyten	85
4.1.4.1.	Ausschluß von Trypanblau	85
4.1.4.2.	Austritt von Lactatdehydrogenase	85
4.1.4.3.	Austritt von Glutamatdehydrogenase	89
4.1.4.4.	Glutathiongehalt der Hepatozyten	92

4.2.	Bestimmung des Kohlenwasserstoffgehalts der Atemluft von Labortieren als Indikator für Lipidperoxidation in vivo	94
4.2.1.	Lipidperoxidation durch Bromtrichlormethan in vivo	96
4.2.2.	Kohlenwasserstoffabatmung nach akuter Ethanolintoxikation	100
4.2.3.	Spezlesunterschiede	105
4.2.4.	Einfluß der Fütterung	108
4.2.5.	Vorbehandlung mit Phenobarbital	108
4.2.6.	Einfluß unterschiedlicher Ethanoldosen	111
4.2.7.	Einfluß unterschiedlicher Diethyldithiocarbamatdosen	111
4.2.8.	Chronische Ethanolbehandlung und Kohlenwasserstoffabgabe	115
4.2.9.	Behandlungsformen ohne nachfolgend erhöhte Kohlenwasserstoffproduktion	122
4.3.	Kohlenwasserstofffreisetzung in vitro	123
4.3.1.	Versuche mit der isoliert perfundierten Leber	123
4.3.2.	Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen	129
4.3.2.1.	Lipidperoxidation mit NADPH	129
4.3.2.2.	Lipidperoxidation mit Eisen/ADP	131

4.4.	Elimination von Kohlenwasserstoffen aus einem geschlossenen Expositionssystem in vivo	135
4.4.1.	Ethan-Elimination	137
4.4.2.	Propan-Elimination	137
4.4.3.	n-Butan-Elimination	140
4.4.4.	n-Pentan-Elimination	140
4.4.5.	1-Buten-Elimination	144
4.4.6.	Elimination von Kohlenwasserstoff-gemischen	144
4.5.	Methanabatmung in vivo	146
4.5.1.	Beeinflussung der Methanproduktion	149
4.5.1.1.	Hemmstoffe von Cytochrom P-450	149
4.5.1.2.	Einfluß der Fütterung	151
4.5.1.3.	Antibiotikabehandlung	151
4.5.1.4.	Absetzen der chronischen Ethanol-behandlung	151
4.5.1.5.	Infektion	151
4.5.2.	Methanabatmung beim Menschen	155
5.	Diskussion	159
5.1.	Lipidperoxidation in isolierten Hepatozyten	160
5.2.	Lipidperoxidation in vivo	168
5.3.	Lipidperoxidation in Lebermikrosomen	177
5.4.	Methanexhalation in vivo	180
5.5.	Abschließende Bemerkungen	184
	LITERATUR	

Liste der Abbildungen

Nr.		Seite
1.1.	Schematisierte Darstellung des Schicksals von Fremdstoffen/Arzneimitteln im Organismus	2
1.2.	Stoffwechselwege für Ethanol und ihre intrazelluläre Verteilung	8
1.3.	Stoffwechselwege von Tetrachlorkohlenstoff	17
1.4.	Reaktionsschema für den Radikal-induzierten peroxidativen Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren	29
2.1.	Schema der gasdichten Perfusionsanlage für isolierte Rattenlebern	33
2.2.	Ganzglasexsikkatorsystem zur Kollektion der Atemgase in vivo	51
2.3.	Elimination von n-Pentan aus dem Gasraum eines statischen Expositionssystems durch zwei männliche Wistar Ratten	58
2.4.	Zweikomponentenmodell für die Elimination flüchtiger Substanzen aus dem Gasraum eines statischen Expositionssystems durch Labortiere	59
3.1.	Dosis-Wirkungskurve für die durch Bromtrichlormethan in isolierten Hepatozyten induzierte Produktion von Thiobarbitursäure-positivem Material	67
3.2.	Zeitlicher Verlauf der Zunahme an Thiobarbitursäure-positivem Material (Malondialdehyd) während der Inkubation von isolierten Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten ohne Vorbehandlung und mit einmaliger Ethanolintoxikation 12 und 36 h vor der Zellgewinnung	69
3.3.	Zeitlicher Verlauf der Malondialdehydbildung bei der Inkubation von Hepatozyten aus weiblichen Wistar Ratten	71
3.4.	Zeitverlauf der Malondialdehydbildung bei Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten ohne Vorbehandlung und nach chronischer Applikation	77

von Saccharoselösung, Ethanol/Glucose-Lösung als alleiniger Trinkflüssigkeit

3.6. Lipidperoxidation in Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten, die zusätzlich zu einer Vitamin E-armen Diät chronisch mit einer Ethanollösung oder einer isokalorischen Saccharoselösung als alleiniger Trinkflüssigkeit versorgt worden sind 80

3.7. Entwicklung von Thiobarbitursäure-positivem Material bei der Inkubation von Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten mit Vitamin E-armer Diät und chronischer Belastung mit Ethanol- oder Saccharoselösung: Werte nach Abzug der endogenen Malondialdehydproduktion 84

3.8. Austritt von Lactatdehydrogenase in das Inkubationsmedium während der Inkubation von Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten 88

3.9. Austritt von Glutamatdehydrogenase in das Inkubationsmedium während der Inkubation von Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten 91

3.10. Abfall der intrazellulären Konzentration an reduziertem Glutathion während der Inkubation von isolierten Hepatozyten 93

3.11. Gaschromatische Auftrennung von 6 ml Eichgasmischung aus flüchtigen Kohlenwasserstoffen auf einer Porasil C-Säule bei 60°C isotherm. 95

3.12. Gaschromatische Auftrennung einer Luftprobe aus dem Gasraum eines Ganzglasexsikkatorsystems nach Bromtrichlormethangabe in vivo 97

3.13. Zeitverlauf der Kohlenwasserstoffakkumulation nach intraperitonealer Bromtrichlormethaninjektion 98

3.14. Einfluß der intraperitonealen Injektion steigender Bromtrichlormethanmengen auf die Kohlenwasserstoffabatmung in vivo 99

3.15. Gaschromatogramme von Proben aus dem Gasraum des Exsikkators bei Kontroll- und mit Ethanol behandelten männlichen Wistar Ratten 102

3.16. Zeitverlauf der Akkumulation von Kohlenwasserstoffen aus der Atemluft männlicher Wistar Ratten nach oraler Applikation von Saline oder Ethanol 103

3.17. Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Kohlenwasserstoffabatmung bei Sprague-Dawley Ratten 104

3.18. Speziesabhängige Induktion der Kohlenwasserstoffabatmung durch akute Ethanolgabe 106

3.19. Einfluß der Fütterung auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch männliche NMRI Mäuse 109

3.20. Einfluß der Vorbehandlung mit Phenobarbital auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch männlichen NMRI Mäuse 110

3.21. Blutalkoholspiegel von männlichen NMRI Mäusen nach oraler Applikation steigender Ethanoldosen 112

3.22. Einfluß steigender Ethanoldosen auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch männliche NMRI Mäuse 113

3.23. Einfluß der Applikation steigender Dosen von Diethyldithiocarbamat auf die Exhalation flüchtiger Kohlenwasserstoffe durch nüchterne männliche Sprague-Dawley Ratten 114

3.24. Einfluß der chronischen Ethanolbehandlung auf die Kohlenwasserstoffabatmung von männlichen Wistar Ratten ohne sowie nach akuter, zusätzlicher Ethanolgabe 117

3.25. Einfluß von Diethyldithiocarbamat auf die Abatmung gasförmiger Kohlenwasserstoffe bei weiblichen Wistar Ratten nach chronischer Behandlung mit Saccharose- oder Ethanollösung 119

3.26. Gasprobe aus dem Gasraum der Leberperfusionsanlage nach Zusatz von Bromtrichlormethan 128
3.27. Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen: Zeitverlauf nach Inkubation mit NADPH 130
3.28. NADPH-induzierte Lipidperoxidation in Mikrosomen von Kontroll- und Ethanol-behandelten Ratten 133
3.29. Induktion von Lipidperoxidation in Lebermikrosomen aus Ratten mit und ohne Ethanolvorbehandlung mit Fe-ADP 134
3.30. Elimination flüchtiger Kohlenwasserstoffe aus dem Gasraum eines statischen Expositionssystems durch zwei männlichen SIV-Ratten in vivo 136
3.31. Nasale und anale Methanabgabe von männlichen Meerschweinchen 148
3.32. Methankonzentration in derendexpiratorischen Luft von gesunden Freiwilligen 158

1. Einleitung

Gelangen Fremdstoffe zum Beispiel durch die Nahrung bewußt oder unbeabsichtigt oder aus einer medizinischen Indikationsstellung heraus in einen Organismus, so kommt es zu einer Wechselwirkung mit ihm. Diese stellt ein komplexes Geschehen dar, das von zwei Hauptkomponenten bestimmt wird:

1. vom Verhalten des Stoffes gegenüber dem Organismus, genannt Pharmako- oder Toxikodynamik und
2. dem Verhalten des Organismus gegenüber dem Fremdstoff, genannt Pharmako- oder Toxikokinetik.

Abb. 1.1. soll eine schematische Übersicht dazu vermitteln.

Die Aufnahme erfolgt bei lipophilen Substanzen spontan durch Diffusion durch die Epithelien und Endothelien. Andere Aufnahmemöglichkeiten sind Transport durch Carrier oder Phagozytose sowie Applikation durch Injektion. Erreicht der Fremdstoff nach dem Eintritt in den Organismus das Blut, so wird er von diesem durch den gesamten Organismus transportiert, wo er sich, gegebenenfalls nach Überwindung spezifischer Gewebeschranken, gemäß seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften zwischen den einzelnen Geweben verteilt (Klaassen, 1980). Durch Interaktion mit Rezeptoren (=biologischen Makromolekülen) entfaltet er seine spezifische Wirkung.

Nach Aufnahme in die Leberparenchymzellen, aber auch in Niere, Darmmucosa, Lunge und Haut unterliegen lipophile Fremdstoffe einer Biotransformation durch Enzyme des endoplasmatischen Reticulums und des Cytoplasmas, die durch Einführung hydrophiler Gruppen in sogenannten Phase-1 und Phase-2-Reaktionen die Wasserlöslichkeit des Moleküls erhöhen und so die biliäre und renale Ausscheidung erleichtern bzw. überhaupt erst ermöglichen (Neal, 1980; Jenner und Testa, 1978; Pannatier et al., 1978). Die Hauptausscheidungswege führen über Niere und Galle, bei Substanzen mit hohem Dampfdruck auch über die Lunge. Nebenwege führen

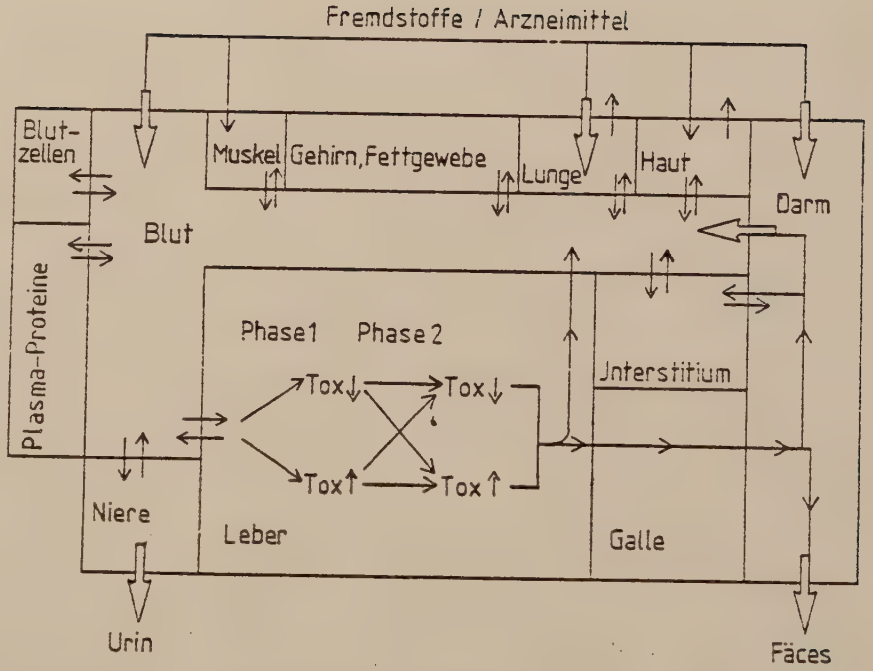


Abbildung 1.1.: Schematisierte Darstellung des Schicksals von Fremdstoffen/Arzneimitteln im Säugetierorganismus (nach Klaasen, 1980)

über Haut, Haare und Fingernägel.

Nach der Phase-1-Reaktion, also nach Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse, sowie nach der Phase-2-Raktion, also nach der Konjugation mit Glucuronsäure, Glutathion, Aminosäuren sowie Acetat- oder Methylgruppen, entstehen Substanzen, die ein mehr oder weniger stark verändertes pharmako- oder toxikodynamisches Verhalten zeigen:

1. Diese Metabolite können (Mitchell et al., 1975) pharmakologisch weniger wirksam und/oder weniger toxisch sein als die Muttersubstanz
2. die pharmakologische und/oder toxische Wirkung der Muttersubstanz beruht auf einer reversiblen Interaktion des oder der Metaboliten mit Rezeptoren des Organismus, oder
3. der Metabolismus führt zu einer chemisch hochreaktiven Substanz, die irreversibel an Biomoleküle wie Proteine, RNA und DNA bindet und damit Prozesse wie Karzinogenese, Mutagnese und allergische Reaktionen einleitet. Löst der hochreaktive Metabolit Lipidperoxidation aus, so kann es zu Membrandefekten und damit zur Zerstörung der Zellsubstruktur mit anschließendem Zelltod (Nekrose) kommen.

1.1. Toxikologie des Ethylalkohols

Akute Ethanolintoxikation zeigt sowohl dämpfende als auch erregende Wirkung. Beide Wirkungen sind Folge einer Hemmung der Aktivität von Neuronen. Der Grund für das Auftreten von Erregungszuständen bei kleineren Dosen ist der wegen ihrer höheren Empfindlichkeit frühere Ausfall inhibitorischer Neuronen des Zentralnervensystems. Höhere Dosen (Blutalkoholgehalt: 5g/l und höher) führen durch Lähmung des Atem- und Kreislaufzentrums zum Tode (Coper, 1980).
Weiterhin kann bei Mensch und Ratte nach akuter Ethanolgabe eine reversible Verfettung der Leber beobachtet werden (Rubin und Lieber, 1968).

Die durch Ethanol hervorgerufenen akuten und chronischen Erkrankungen stellen ein ernstes gesundheitspolitisches Problem dar.
Nach Feuerlein (1977) sind nach dem Konsum größerer Mengen Ethanol über den Zeitraum von Jahren die in Tabelle 1.1. dargestellten Organschäden aufgetreten. Es konnte dabei eine klare Beziehung zwischen Gesamtalkoholaufnahme und prozentualer Häufigkeit zum Beispiel der Zahl der aufgetretenen Leberzirrhosen hergestellt werden. Obe et al. (1977) konnten überraschenderweise mutagene Wirkungen nachweisen. Diese Autoren beobachteten, daß der Ethanolmetabolit Acetaldehyd dafür verantwortlich ist. Weiterhin wurden Befunde beschrieben, die zeigen, daß Ethanol teratogen ist (Jones et al., 1973).

1.1.1. Ethanolstoffwechsel

Obwohl Spuren von Ethanol endogen synthetisiert werden können (Lester, 1961), ist er jedoch hauptsächlich eine exogene Substanz, die leicht über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen wird. Nur zwei bis zehn Prozent der absorbierten Dosis werden unverändert durch Niere und Lunge elimi-

Tabelle 1.1.: Organschäden (Krankheiten) durch chronischen Konsum größerer Mengen an Ethanol (nach Feuerlein, 1977)

Leber	Alkoholisches Lebersyndrom von der Fettleber bis zur Zirrhose
Magen-Darm	Alkoholische Gastritis, Resorptionsstörungen
Pankreas	Chronische Pankreatitis, kalzifizierende Pankreatitis
Parotis	Parotisschwellung
Endokrinum	Hodenatrophie, Funktionsstörung der Nebennierenrinde, Gynäkomastie
Fettstoffwechsel	Adipositas, Hyperlipämie
ZNS	Korsakow, Delirium tremens, neurotische und psychotische Reaktionen, Wernicke-Enzephalitis, Hirn- und Kleinhirnrindenatrophie
Periphere Nerven	Polyneuropathie
Herz	Alkohol-Myokardiopathie
Kreislauf	Arteriosklerose (?), Teleangiektasien, Spinnen, Weißfleckung, Palmarerythrem,
Muskel	Myopathie
Blut	Hämolytische Anämie, Thrombopenie, abnorme Leukozytenreaktion

niert, der Rest wird im Körper metabolisiert, wobei der überwiegende Teil des Stoffwechsels in der Leber stattfindet. Der Abfall der Blutalkoholkonzentration wird durch Schädigung der Leber oder Hepatektomie stark verringert oder gestoppt. Der extrahepatische Ethanolstoffwechsel ist zwar vorhanden, spielt aber nur eine untergeordnete Rolle (Lieber, 1970).

Es wird allgemein angenommen, daß der erste Schritt des Ethanolstoffwechsels seine Oxidation zu Acetaldehyd unter dem Einfluß des zinkhaltigen Enzyms Alkoholdehydrogenase (ADH) ist. ADH wurde aus dem Cytoplasma von Leberzellen isoliert. In vitro liegt das pH-Optimum für die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd zwischen zehn und elf, während unter physiologischen Bedingungen die umgekehrte Reaktion bevorzugt wird. Es muß aber angenommen werden, daß in vivo die Ethanoloxidation eng mit den Reaktionen gekoppelt ist, die das Reaktionsprodukt Acetaldehyd entfernen (v. Wartburg et al., 1964). Die Aktivität der ADH ist nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sondern die Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der Bereitstellung des Kofaktors NAD, insbesondere aber von der Geschwindigkeit der Reoxidation des ADH-NADH-Komplexes ab (Theorell und Bonnichsen, 1951).

Neben der soeben geschilderten Ethanoloxidation durch ADH (Alkohol-NAD: Oxidoreduktase, E.C. 1.1.1.1.) im Cytoplasma werden noch zwei weitere Abbauwege diskutiert: Lieber und DeCarli (1968, 1970) beschrieben das sogenannte "microsomal ethanol oxidizing system" (MEOS). Dieses befindet sich im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen, ist durch Ethanolapplikation und Vorbehandlung mit Pharmaka induzierbar, benötigt als Kofaktor NADPH und kann in vitro durch Kohlenmonoxyd gehemmt werden. Sein pH-Optimum liegt im physiologischen Bereich. Daneben kann Ethanol aber auch durch die peroxidatische Wirkung der Katalase oder eines anderen Hämoproteins zu Acetaldehyd umgesetzt werden. Ka-

talase befindet sich in den Perixsomen und erhält H_2O_2 von H_2-Donatoren wie Xanthin über die Xanthinoxidase-Reaction. Katalase befindet sich aber auch in der mikrosomalen Fraktion der Leberzellen (Lieber und DeCarli, 1973). H_2O_2 wird hier durch die NADPH-Oxidase (Thurman et al., 1975) oder Cytochrom P-450 (Hildebrandt et al., 1973) bereitgestellt. Mikrosomen produzieren besonders dann viel H_2O_2, wenn sie mit bestimmten Substraten inkubiert werden. Der Katalase-abhängige Ethanolstoffwechsel ist durch Azid (Lieber und DeCarli, 1970), durch Aminotriazol (Thurmann et al., 1975) und durch KCN (Oshino et al., 1974) hemmbar.

Die Bedeutung der soeben geschilderten Stoffwechselwege für die Oxidation von Ethanol in vivo wird aber bestritten (Rognstad und Grunnet, 1979). Mezey und Tobon (1971) fanden zwar erhöhte MEOS-Aktivität in Leberbiopsien von chronischen Alkoholikern und machten dies für die erhöhte Blutalkoholelimination verantwortlich. Thurman et al. (1975) konnten dagegen zeigen, daß die Verunreinigung der Mikrosomenpräparationen mit Katalase für den Ethanolumsatz verantwortlich gemacht werden kann. Dieselben Autoren sahen in der Tatsache, daß MEOS im Gegensatz zu Katalase auch längerkettige Alkohole wie Propanol und n-Butanol oxidieren kann, Katalase aber nur Methanol und Ethanol peroxidiert, einen Hinweis darauf, daß die MEOS-Präparationen mit ADH, das eine große Zahl von Substraten umsetzen kann, verunreinigt sind. Die peroxidatische Aktivität der Katalase gegenüber Ethanol hängt von der Bereitstellung von H_2O_2 ab. Thurman und McKenna (1974) beobachteten ein Ansteigen der Ethanolverwertung durch isoliert perfundierte Rattenlebern, wenn der Perfusionslösung H_2O_2-Bildner wie Urat oder Glycolat zugesetzt wurden. Es bleibt aber die Frage bestehen, ob das im Cytosol gebildete H_2O_2 nicht präferentiell mit der Glutathionperoxidase, die einen sehr niedrigen K_m für H_2O_2 besitzt, reagiert und dann für den Ethanolstoffwechsel nicht mehr zur Verfügung steht (Rognstad und Grunnet, 1979).

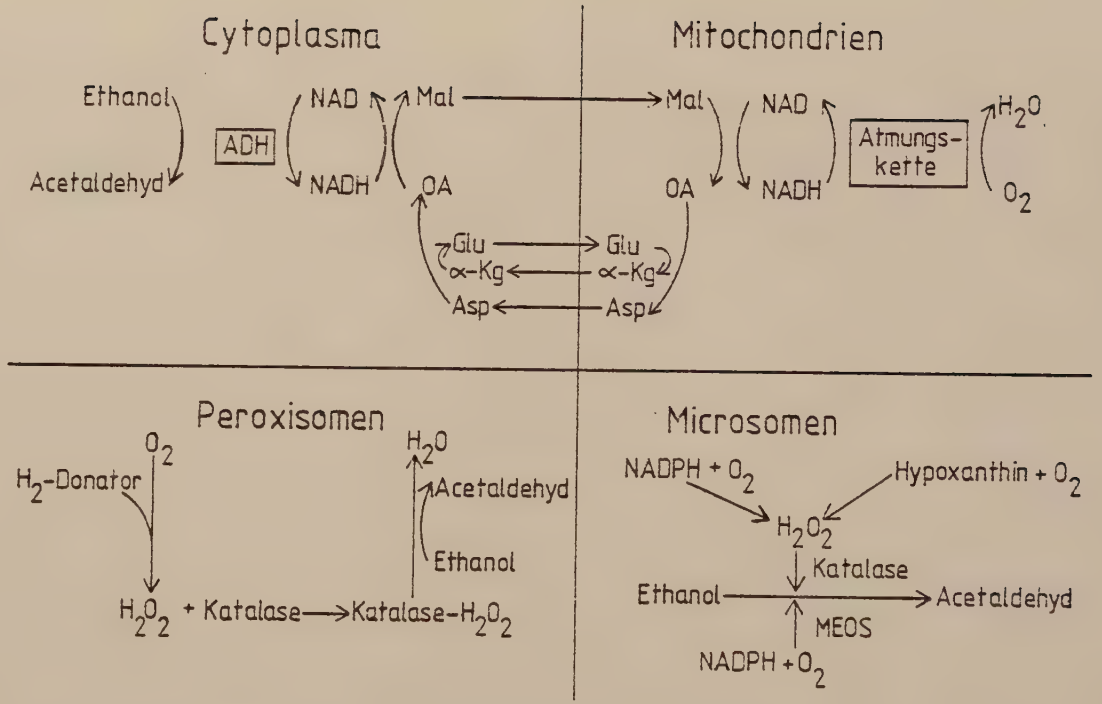


Abbildung 1.2.: Stoffwechselwege für Ethanol und ihre intrazelluläre Verteilung (nach Thurman et al., 1975)

Dow und Goldberg (1975) konnten bei Meerschweinchen mit Vitamin-C-Mangel keine Beteiligung der Mikrosomen am Ethanolstoffwechsel feststellen. Obwohl diese Tiere verringerte Aktivitäten der Enzyme Anilin-Hydroxylase, NADPH-Oxidase und Cytochrom P-450 aufwiesen, war die Ethanolelimination in vivo nicht beeinträchtigt. Ethanolbehandlung induzierte weder die mikrosomalen Enzyme noch wurde das Absinken der Blutalkoholkonzentration beschleunigt.

Grundsätzlich kann aber Cytochrom P-450 Alkohole peroxidatisch umsetzen. Die Arbeitsgruppe Coon (Nordblom et al., 1976) beschrieb diese Möglichkeit für die Fe^{3+}-Form des isolierten Enzyms und zeigte, daß die bekannten anderen Bestandteile der mikrosomalen Elektronentransportkette, NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase und Cytochrom b-5, an dieser Reaktion nicht beteiligt sind. Rahimtula und O'Brien (1977) wiesen peroxidatischen Ethanolstoffwechsel in Lebermikrosomen und gereinigten Katalase- und Cytochrom P-450-Präparationen nach. Mit Cumolhydroperoxid als Substrat konnten diese Autoren neben dem Ethanolumsatz auch die Oxidation höherer Alkohole wie Propanol, 1-Butanol und 1-Pentanol nachweisen. Phenobarbitalvorbehandlung beschleunigte diese Reaktionen. Mit H_2O_2 als Substrat konnte die verstärkende Wirkung der Phenobarbitalvorbehandlung nicht demonstriert werden. Dies hängt aber wahrscheinlich mit der niedrigen Affinität von Cytochrom P-450 für exogenes H_2O_2 (Nordblom et al., 1976) oder der geringen Membranpermeation von H_2O_2 zusammen.

1.1.2. Acetaldehydstoffwechsel

Acetaldehyd ist pharmakologisch aktiv. Es trägt zur Wirkung der akuten Ethanolintoxikation und den unangenehmen Nachwirkungen bei (Raskin, 1975). Die Bildung von Tetrahydroisochinolinen aus Acetaldehyd und Katecholaminen könn-

te zur Entwicklung der Alkoholsucht beitragen (Myers und Melchior, 1977). Das mutagene Potential von Acetaldehyd wurde von Obe et al. (1977) demonstriert.

Nach Ethanolaufnahme werden beim Menschen im Blut Acetaldehydkonzentrationen von 0,02 mM und geringer beobachtet. Prämedikation mit Disulfiram oder seinem Reduktionsprodukt Diethyldithiocarbamat erhöhen die Blutacetataldehydkonzentration bis auf 0,3 mM. D-Penicillamin kann mit Acetaldehyd zu 2,2,5-Trimethylthiazolidin-4-carboxylsäure reagieren, eine Infusion mit D-Penicillamin kann also in vivo die durch Disulfiram erhöhten Acetaldehydspiegel wieder absenken (Nagasawa et al., 1977).

Acetaldehyd wird durch die Aldehyddehydrogenase (E.C. 1.2.1.3.) zu Acetat oxidiert. Kosubstrat ist dabei NAD. Isoenzyme der Aldehyddehydrogenase kommen im Cytoplasma (Deitrich et al., 1975), im mitochondrialen Matrixraum, an der äußeren Mitochondrienmembran und in Mikrosomen vor (Greenfield et al, 1976). Diese Isoenzyme unterscheiden sich durch ihre Affinität zu Acetaldehyd und ihre Induzierbarkeit durch Ethanolbehandlung oder Phenobarbitalapplikation. Aldehyddehydrogenasen werden durch Disulfiram, Pargyline, n-Butyraldoxim und Pyrogallol gehemmt (Demblec et al., 1976). Auch mit Hilfe der Xanthinoxidase kann Acetaldehyd umgesetzt werden (Goodman und Meany, 1974). Die Geschwindigkeit der Acetaldehydoxidation korreliert aber nicht mit der Enzymaktivität in der Leber, sondern hängt vom Redoxzustand der Mitochondrien, also ihrer Fähigkeit zur Reoxidation des NADH, ab (Eriksson, 1977).

1.1.3. Beeinflussung der Biochemie der Leber durch Ethanol und Acetaldehyd

Nur 2-10 Prozent einer akuten Ethanoldosis werden durch Lunge und Niere eliminiert. Der Rest wird fast ausschließlich in der Leber oxidiert, die die überwiegende Menge der Enzyme enthält, die dem Organismus für die Oxidation von Ethanol zur Verfügung stehen. Diese relative Organspezifität erklärt wahrscheinlich, warum trotz der Existenz von intrazellulären Mechnismen, die für eine Homöostase sorgen sollen, die Ethanoloxidation zu auffälligen metabolischen Ungleichgewichten in der Leber führt. Dies wird durch die Tatsache verstärkt, daß kein Rückkopplungsmechanismus existiert, der die Geschwindigkeit der Ethanoloxidation an die metabolischen Verhältnisse der Leberzelle anpaßt. Weiterhin besitzt der Organismus im Gegensatz zu anderen Energieträgern für Ethanol keine Speichermöglichkeit. Ethanol kann so bis zu 90 Prozent der Substrate verdrängen, die normalerweise in der Leber verwendet werden (Lieber, 1980).

Wie in Abb. 1.2. dargestellt, führt die Ethanoloxidation zur Übertragung von Wasserstoff auf NAD. Die daraus resultierende Vergrößerung des NADH/NAD-Verhältnisses produziert Veränderungen im Verhältnis der Substanzen, deren Gleichgewichtskonzentration vom Redoxzustand der Zelle abhängt. Die Vergrößerung des NADH/NAD-Verhältnisses wird für eine Reihe von metabolischen Anomalien verantwortlich gemacht, die durch Ethanolmißbrauch entstehen. So führt sie zu einer vermehrten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat, das die Leberzelle verlassen kann. Die Lactatacidämie führt zu einer verminderten Harnsäureausscheidung und damit zu einer sekundären Hyperurikämie, die akute Gichtanfälle auslösen kann (Isselbacher, 1977). Weiterhin führt das vergrößerte NADH/NAD-Verhältnis zu einer Aktivierung der δ-Aminolävulinsäure-Synthetase und nachfolgender erhöhter Porphobilinogenproduktion (Held, 1977).

Das erhöhte NADH/NAD-Verhältnis hebt die Konzentration von α-Glycerophosphat an. Damit wird die Akkumulation von Triglyceriden durch den Einbau freier Fettsäuren gefördert. Diese Akkumulation wird aber auch noch durch einen zweiten Mechanismus hervorgerufen: Die Wasserstoffäquivalente werden über verschiedene "Shuttle"-Wege in die Mitochondrien geführt. Wegen der Depression der NAD-abhängigen Schritte des Zitronensäurezyklus, besonders der Oxidation von α-Ketoglutarat, aber auch der Erniedrigung des für die Aktivität der Citrat-Synthetase notwendigen Oxalacetats, benutzen die Mitochondrien bevorzugt die aus der Ethanoloxidation stammenden Wasserstoffäquivalente und nicht die aus dem Citronensäurecyklus herrührenden Fettsäuren, die normalerweise als Energiequelle in der Leber benutzt werden. Dies führt zu einer Ablagerung von Fett aus der Nahrung und aus der endogenen Synthese, und kann als Hauptursache für die Entwicklung der alkoholischen Fettleber, die erste Stufe der Ethanol-bedingten Leberschädigung, betrachtet werden (Lieber, 1980). Daneben fördert der Überschuß an NADH die Neusynthese von Fettsäuren (Lieber et al., 1975). Der Export der Triglyceride mit Hilfe der vermehrt synthetisierten Lipoproteine führt zu einer Hypertriglyceridämie.

Sind die Glycogenspeicher der Leber entleert, so führt Ethanolapplikation zu Hypoglykämie! Zum einen wird durch die Vergrößerung des intramitochondrialen NADH/NAD-Quotienten die Pyruvatcarboxylase gehemmt, zum anderen setzt Ethanolbehandlung die Aktivität eines zweiten Schlüsselenzyms der Gluconeogenese, Fruktose-Diphosphatase, herab (Stifel et al., 1976). Weiterhin ist durch das vergrößerte NADH/NAD-Verhältnis die cytoplasmatische Oxalacetatkonzentration erniedrigt.

Obwohl der genaue Mechanismus des Acetaldehydstoffwechsels noch immer strittig ist, wird doch allgemein angenommen, daß Acetaldehyd hauptsächlich mit Hilfe der Aldehyd-Dehy-

drogenase in den Mitochondrien oxidiert wird. Dabei entsteht wiederum NADH, und daher werden einige der durch Acetaldehyd ausgelösten Wirkungen, wie schon für Ethanol beschrieben, der Vergößerung des intramitochondrialen NADH/NAD-Quotienten zugeschrieben. Acetaldehyd ist eine hochreaktive Substanz mit ausgeprägt neurotoxischen Eigenschaften.

In der Leber werden hauptsächlich die Mitochondrien von Acetaldehyd geschädigt. Iseri et al. (1966) beschrieben massive morphologische Veränderungen wie Schwellung, Verdichtung der Matrix, Verlust von Matrixgranula und bizarre Formen. Korsten et al. (1975) fanden, daß Alkoholiker höhere Blutacetaldehydkonzentrationen aufwiesen als Nichtalkoholiker. Hasamura et al. (1975) konnten zeigen, daß Mitochondrien von Ratten, die chronisch Ethanol in ihrer Diät bekommen hatten, eine verringerte Kapazität zu Acetaldehydoxidation aufwiesen. Die Atmung dieser Mitochondrien war nach Acetaldehydapplikation vermindert. Ein weiterer Angriffspunkt für Acetaldehyd sind die Mikrotubuli der Leberzelle. In isolierten Hepatozyten verminderte Ethanolapplikation den Gehalt an Tubulin. Dieser Effekt konnte durch Inkubation mit Acetaldehyd ebenfalls erzeugt werden (Matsuda et al., 1979).

Chronische Ethanolintoxikation führt zur Proliferation des endoplasmatischen Retikulums (Rubin et al., 1968). Da hier die Enzyme lokalisiert sind, die für die Umwandlung von Fremdstoffen verantwortlich sind, ist es nicht überraschend, daß bei Menschen und Ratten ein verstärkter Abbau von Meprobamat und Pentobarbital in vivo nach chronischer Ethanolvorbehandlung demonstriert werden konnte (Misra et al., 1971).
Rubin et al. (1976) konnten zeigen, daß auch der Testosteron-Metabolismus in der Leber erhöht ist, und so eine Korrelation zu dem bei Alkoholikern häufigen Hypogonadismus herstellen.

Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Israel (Israel et al., 1975) zeigen, daß chronische Ethanolapplikation bei Ratten zu einem hypermetabolischen Zustand führt, der durch vermehrte Sauerstoffaufnahme der Leberzellen bei vermindertem cytoplasmatischem ATP-Gehalt gekennzeichnet ist. Da die Mitochondrien unter diesen Bedingungen weiterhin streng gekoppelt sind, mußte eine andere Ursache für den vermehrten ATP-Verbrauch gefunden werden. Es zeigte sich, daß die Aktivitäten der Natrium-Pumpe und der Na/K-ATPase stark vermehrt waren, ein Bild, das von der Thyroxin-Wirkung her bekannt ist. Die so erzeugte Beschleunigung der mitochondrialen Atmung durch Abführung des ATP führte zu einer Normalisierung des NADH/NAD-Quotienten und erklärt, warum die nach akuter Ethanolintoxikation beobachteten und auf den vergrößerten NADH/NAD-Quotienten zurückgeführten Veränderungen des Leberstoffwechsels nach chronischer Ethanolapplikation zurückgebildet werden. Gleichzeitig wird dieser Adaptionsmechanismus für die Beschleunigung des Ethanolstoffwechsels nach chronischer Ethanolbelastung verantwortlich gemacht, da nun eine beschleunigte Reoxidation des Alkoholdehydrogenase-NADH-Komplexes möglich wird. Andere Autoren (Cederbaum et al., 1978) bestreiten dieses Konzept und erklären die erhöhte Ethanoloxidation in der Leber nach chronischer Ethanolvorbehandlung mit einer Induktion des MEOS-Systems der Mikrosomen.

1.1.4. Leberschäden durch Ethanol

Bei Labortieren und beim Menschen (Smuckler, 1975; Rubin et al., 1968) führt bereits eine einmalige Ethanolgabe zur Akkumulation von Triglyceriden in der Leber. Diese Veränderung ist reversibel (Gordon und Lough, 1972).

Beim Menschen und beim Primaten (Lieber und DeCarli, 1975) führt chronischer Ethanolabusus zu einer Reihe weiterer

morphologischer Veränderungen: Auf die Nekrose der Leberparenchymzellen folgt eine entzündliche Reaktion mit Einwanderung von Granulozyten, die alkoholische Hepatitis. Aus dieser kann sich eine Leberzirrhose entwickeln, die eine irreversible Schädigung dieses Organs darstellt. Daneben kann sich ein totales Leberversagen mit Coma hepaticum einstellen (Orrego und Israel, 1980).

Die Ätiologie der Lebernekrose ist noch nicht abgeklärt: Ursprünglich wurde das Konzept der Mangelernährung vertreten (Best et al., 1949). Dann wurde Lipidperoxidation als Erklärung herangezogen (Di Luzio, 1966; Di Luzio und Hartman, 1967). Lyse der Hepatozyten durch Überladung mit Triglyceriden und Protein als Ausdruck der mikrotubulären Degeneration und daraus resultierenden Sekretionsstörungen werden diskutiert (Matsuda et al., 1979). Feinman und Lieber (1972) spekulieren, daß die vermehrte Kollagenansammlung auf einer auf das vermehrte Lactatangebot zurückzuführenden Erhöhung der Prolinhydroxylase beruht. Daneben wurde auch die Rolle des Immunsystems auf die Entwicklung der Leberschädigung untersucht. Periphere Lymphozyten von Alkoholikern reagierten auf Kontakt mit gereinigtem alkoholischen Hyalin, einem fibrillären basischen Protein, das bei degenerativen Leberschäden beobachtet wird (Okamura et al., 1975), mit der Freisetzung von "migration inhibiting factor" (Leevy et al., 1975).

1.2. Toxikologie mehrfach halogenierter Methane

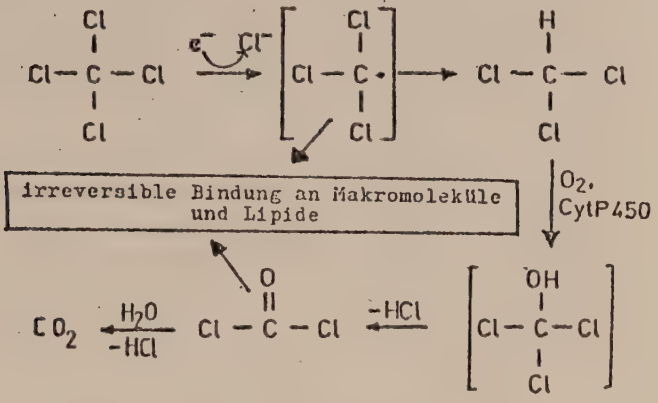
Klinische Symtome der CCl_4-Vergiftung manifestieren sich hauptsächlich als Leber- und Nierenschäden. Sie treten gewöhnlich nach zwei bis vier Tagen auf und sind im allgemeinen die Todesursache. Als post mortem Veränderungen wurden beschrieben: Lebervergrößerung, Fettleber mit kleinen zentrilobulären Nekrosen, Nierenvergrößerung, degenerierte Nierentubuli (Nekrose und Verfettung des Tubulusepithels), daneben aber auch subendokardiale Blutungen, hämorrhagische Bronchiopneumonien, Ikterus und subkutane Blutungen (Polson und Tattersale, 1969).

Am Ganztier ist CCl_4 eindeutig carcinogen, Mutagenität im Ames Test konnte aber nicht demonstriert werden (IARC, 1979). Bei Reinigungsarbeitern, die alle eine Vorgeschichte mit CCl_4-, Trichlorethylen- und Tetrachlorethylenexposition aufwiesen, wurde eine erhöhte Incidenz an Lebertumoren und Leukämie gefunden.

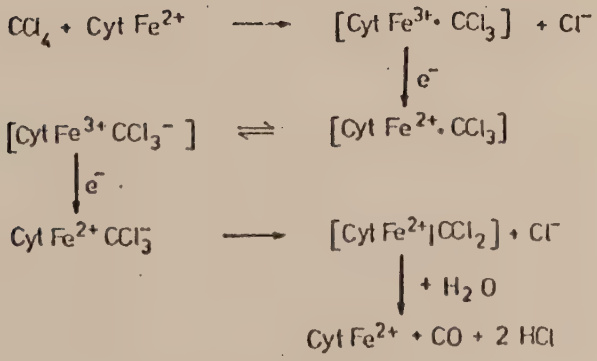
Die Toxizität von CCl_4 ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Im Ganztier außer bei Sauropsien konnte experimentell mit CCl_4 die gleiche Veränderung der Leber wie beim Menschen beobachtet werden: Chronische Exposition mit CCl_4 führte zu Fibrose, Pseudolobuli, Störung der hepatischen Blutzirkulation, portaler Hypertension, Ascites und schließlich zur ausgeprägten Cirrhose mit Leberversagen (Cornish, 1980).

CCl_4 muß durch die Enzyme des endoplasmatischen Retikulums metabolisiert werden, um seine toxische Wirkung auf die Leber entfalten zu können (Recknagel et al., 1977). Die Stoffwechselwege unter aeroben und anaeroben Bedingungen sind in Abb. 1.3. dargestellt. Am endoplasmatischen Retikulum zeigt CCl_4 zuerst sein schädigendes Potential (Heni und Remmer, 1971; Reiner et al., 1972).

Abbildung 1.3.: Stoffwechselwege von Tetrachlorkohlenstoff



A: Stoffwechsel unter aeroben Bedingungen



B: Stoffwechsel unter anaeroben Bedingungen

Erhöhung des Gehalts an Cytochrom P-450 durch Phenobarbitalvorbehandlung steigert den Stoffwechsel von CCl_4 und erhöht die Toxizität, während umgekehrt die Hemmung der mikrosomalen Enzyme durch SKF 525-A (Reynolds and Moslen, 1974) und Diethyldithiocarbamat (Siegers et al., 1978) zu einer Verringerung führt.

Inzwischen ist durch zahlreiche Arbeiten belegt, daß die toxische Wirkung von CCl_4 auf seiner metabolischen Umwandlung in das reaktionsfähige CCl_3-Radikal (Slater, 1972; Koch et al., 1974) bzw. dem daraus entstehenden Trichlormethylperoxiradikal (Slater, 1979) beruht. Bini et al. (1975) haben in vivo und Uehleke et al. (1973) in vitro Hexachloräthan als Dimerisierungsprodukt zweier Trichlormethylradikale nachweisen können. Slater (1966) postulierte, daß die Hepatotoxizität homologer Methylhalogenide mit der Dissoziationsenergie der Kohlenstoff-Halogen-Bindung korreliert ist. In der Tat zeigte sich, daß Bromtrichlormethan, bei dem die Kohlenstoff-Brom-Bindung nur eine Dissoziationsenergie von 49 kcal/Mol hat gegenüber der Kohlenstoff-Chlor-Bindung bei CCl_4 mit einer Dissoziationsenergie von 68 kcal/Mol, wesentlich stärker hepatotoxisch wirkte als CCl_4 (Koch et al., 1974; Slater, 1972; Maling et al., 1975; Pesh-Imam und Recknagel, 1977).

Die CCl_3-Radikale können irreversible Bindungen mit Makromolekülen und Lipiden in vivo (Castro und Diaz Gomez, 1972) und in vitro (Uehleke et al., 1973) eingehen. In einer neueren Arbeit wurde sogar die Alkylierung von Kernbestandteilen beschrieben (Diaz Gomez und Castro, 1980).
Damit wird der bei der CCl_4-Vergiftung beobachtete Abfall mikrosomaler Enzyme wie Glucose-6-Phosphatase (Recknagel und Goshal, 1966b) und Cytochrom P-450 (Smuckler et al., 1967; Heni und Remmer, 1971) erklärt.
Daneben lösen Bromtrichlormethan und CCl_4 in vivo (Recknagel und Goshal, 1966a; Slater, 1972) und in vitro (Slater und Sawyer, 1971; Reiner et al., 1972) Lipidperoxidation

aus. Die oxidative Zerstörung von Membranlipiden verändert das Milieu der Enzyme, für deren Funktion eine intakte Membranstruktur unerläßlich ist. Zusätzlich kann Malondialdehyd, ein Abbauprodukt von Fettsäurehydroperoxyden, durch Ausbildung von Schiff'schen Basen mit den ε-Aminogruppen der Lysinanteile von Membranproteinen zur Vernetzung dieser Proteine führen und so die enzymatische Aktivität herabsetzen (Tappel, 1973).

1.3. Lipidperoxidation

1966 veröffentlichte Slater eine kurze Übersicht über die nekrogene Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff. In dieser Arbeit spekulierte er über einen Wirkungsmechanismus, der darauf beruht, daß die Muttersubstanz zu einem toxischen Intermediärprodukt aktiviert wird. Die homolytische Spaltung der Kohlenstoff-Chlor-Bindung sollte im endoplasmatischen Retikulum stattfinden, und dabei sollten freie Radikale entstehen. Diese freien Radikale sollten dann mit der Lipid-reichen Umgebung interagieren und Veränderungen in Struktur und Funktion hervorrufen. Recknagel und Goshal (1966d) kamen zu den gleichen Schlußfolgerungen.

Butler (1961) konnte zeigen, daß Tetrachlorkohlenstoff zu Chloroform verstoffwechselt wird und daraus geschlossen, daß diese Umsetzung durch eine homolytische Spaltung bewirkt wird. Wirtschafter und Cronyn (1964) schlugen eine allgemeine Theorie für die Toxizität von chlorierten Lösungsmitteln vor, in der die Wechselwirkung mit freien Radikalen für die toxische Wirkung angenommen wird. Zuvor hatte Hove (1948) entdeckt, daß die Mortalität durch CCl_4 bei Ratten, die mit einem Vitamin E-armen Futter ernährt worden sind, durch zusätzliche Gabenvon Vitamin E verringert werden kann. Der Schutzeffekt von Antioxidantien wurde auch durch Gallagher (1962) untersucht. Er fand, daß Vitamin E, Diphenyl-p-phenylendiamin und Selen protektiv wirkten. Deshalb kann geschlossen werden, daß destruktive Lipidperoxidation an der toxischen Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff beteiligt ist.

Recknagel und Goshal haben 1966 (1966c) die Hypothese aufgestellt, daß die bei der homolytischen Spaltung von CCl_4 gebildeten freien Radikale die Methylenbrücken der ungesättigten Fettsäureanteile der mikrosomalen Membranlipide angreifen und so die Morphologie des endoplasmatischen Retikulums verändern. Das Ergebnis dieser Änderung sind Ver-

lust an Aktivität der Arzneimittel abbauenden Enzyme und der Glukose-6- Phosphatase, Abnahme der Proteinbiosynthese und Verlust der Fähigkeit, Lipoproteine zu bilden und auszuscheiden. Die Autoren konnten zeigen, daß Tetrachlorkohlenstoff in vitro prooxidativ wirkt, und daß dieser Effekt auf die Leber beschränkt ist. Wenn Lipidperoxidation auftrat, konnten konjugierte Diene, die ein typisches Zeichen peroxidierter polyenoischer Fettsäuren darstellen, nachgewiesen werden. In einer nachfolgenden Arbeit (Recknagel und Glende, 1973) konnte das Auftreten von konjugierten Dienen in Labortieren und beim Menschen nach CCl_4-Vergiftung demonstriert werden.
Vorbehandlung mit Phenobarbital führte zu verstärkter Lipidperoxidation, und die Gabe von SKF 525A verringerte ihr Ausmaß. Diese Arbeiten waren die Grundlage für die Arbeitsgruppe um Recknagel, die Theorie der Lipidperoxidation für die toxische Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff vorzuschlagen.

Reynolds und Yee (1967) haben den Einbau von 14-C-markiertem Kohlenstoff aus 14-C-markiertem Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Dichlormethan, und Methylchlorid verglichen. Von diesen Substanzen verursachen nur CCl_4 und Chloroform Fettlebern und zentrilobuläre Nekrosen. Es konnte folgendes beobachtet werden: Nur nach CCl_4 war die Glukose-6-phosphatase erniedrigt, und der cytoplasmatische RNA-Gehalt erhöht, was als Ausdruck für die Degranulation des endoplasmatischen Reticulums angesehen wird. Ebenfalls konnte nur nach Tetrachlorkohlenstoff ein vorübergehender Kalzium-Einfluß in die Leberzellen festgestellt werden. Die Verschiebung im Markierungsmuster von Cytoplasma zu Mikrososomen, von säurelöslichen Bestandteilen zu Lipiden und von Serin zu Methionin mit ansteigendem Chlorgehalt der untersuchten Verbindungen bestätigte die Hypothese, daß die Hepatotoxizität von Chloroform und CCl_4 zum Teil auf der homolytischen Spaltung dieser Substanzen beruht.

Comporti et al. (1965) konnten ebenfalls zeigen, daß CCl_4, nicht aber Chloroform in vitro die Lipidperoxidation in Lebermikrosomen stimuliert. Homogenate von Rattenlebern aus Tieren, die vor der Organgewinnung mit CCl_4 behandelt worden waren, hatten eine erhöhte Malondialdehydbildungsrate. DiLuzio und Hartman (1969) fanden, daß die Mikrosomen von CCl_4-behandelten Tieren einen niedrigeren Gehalt an lipidlöslichen Antioxidantien besaßen und schlossen daraus auf eine verstärkte Lipidperoxidation.

Benedetti et al. (1977a,b) haben die Veränderung der Membranlipide des endoplasmatischen Retikulums nach Tetrachlorkohlenstoffgabe in vivo untersucht. Sie fanden Hinweise darauf, daß sowohl die einfache Addition des Trichlormethylradikals an freie Fettsäuren als auch der Kettenabbruch durch Kombination von Trichlormethylradikal und Fettsäureradikal stattfinden. Diese Veränderungen konnten in vitro (Benedetti et al., 1977c) ebenfalls beobachtet werden. Bindung von CCl_4 konnte sowohl bei aerober wie auch anaerober Inkubation von Mikrosomen festgestellt werden. Lipidperoxidation (als Malondialdehydproduktion gemessen) und Abfall der Glucose-6-phosphatase ließen sich nur bei aeroben Bedingungen auslösen. Glende et al. (1976) konnten parallel dazu zeigen, daß der Verlust an Cytochrom P-450 nur bei aerober Inkubation und gleichzeitig ablaufender Lipidperoxidation auftrat. Diese Arbeiten stützen sich auf Untersuchungen von Horning et al. (1962), die einen dosisabhängigen Verlust von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden von Rattenlebern nach CCl_4-Intoxikation beschreiben.

Malondialdehydproduktion in vitro ist 40mal stärker, wenn Mikrosomen statt mit CCl_4 mit Bromtrichlormethan (BTM) inkubiert werden (Slater und Sawyer, 1971). Damit korrespondiert ein um den Faktor 50 niedrigerer Wert für die LD_{95} für Ratten (Koch et al., 1974). Es konnte für BTM das gleiche Phänomen gezeigt werden wie für Tetrachlorkohlen-

stoff:Vorbehandlung von Ratten mit CCl_4 (Glende, 1972) oder BTM (Koch et al., 1974) in sehr niedrigen Dosierungen schützte die Tiere vor der hepatotoxischen Wirkung einer sonst stark schädigenden CCl_4-Dosis. Wie bei CCl_4, so wird auch das Ausmaß der irreversiblen Bindung von BTM an Mikrosomenbestandteile durch Vorbehandlung mit Ethanol oder Isopropanol verstärkt. CCl_4 und BTM senken den Gehalt der Leber an Vitamin E in vivo und führen zum Auftreten konjugierter Diene (Pesh-Imam und Recknagel, 1977).

In isolierten Hepatozyten aus Ratten konnten Weddle et al. (1976) eine Verstärkung der Malondialdehydproduktion durch Inkubation mit Tetrachlorkohlenstoff nachweisen. Stacey und Priestly (1978) konnten dies nicht bestätigen. Lindström et al. (1978) konnten erst dann mit CCl_4 Lipidperoxidation in isolierten Hepatozyten auslösen, wenn der intrazelluläre Glutathionspiegel zuvor mit Diethylmaleat abgesenkt worden war. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation von isolierten Leberzellen in der Gegenwart von BTM zu einer massiven Lipidperoxidation (Köster-Ahlbrecht et al., 1978). Dabei läßt sich Malondialdehydproduktion noch dadurch steigern, wenn die Spendertiere vor der Gewinnung der Hepatozyten chronisch mit Ethanol behandelt worden sind (Remmer et al., 1977).

Der Befund, daß das Ausmaß der Leberverfettung bei Ratten nach einmaliger Ethanolgabe durch die Behandlung mit Antioxidantien (N,N'-Diphenyl-p-phenylendiamin und Tocopherolacetat) dramatisch verringert werden kann, ließ DiLuzio (1966) die Hypothese aufstellen, daß auch die hepatotoxische Wirkung von Ethanol mit Lipidperoxidation gekoppelt ist. Homogenate aus Lebern, die von Ratten gewonnen worden waren, die vor der Schlachtung eine einmalige Ethanolgabe bekommen hatten, produzierten mehr Malondialdehyd als Homogenate von Kontrolltieren, die eine isokalorische Glukosemenge bekommen hatten (DiLuzio und Hartman, 1969). Comporti et al. (1967) wiesen nach, daß der Zusatz von

Ethanol zu Leberhomogenaten zu einer verstärkten Malondialdehydbildung führt. Dies wurde von Bunyan et al. (1969) bestätigt, ebenso von Takada et al. (1970). Comporti et al. (1971) fanden nach Ethanolapplikation ein Absinken der Arachidonsäurekonzentration in den Phospholipiden der Membranen von Lebermitochondrien, nicht aber der Mikrosomen. Konjugierte Diene konnten aber nicht nachgewiesen werden. MacDonald (1973) konnte nur bei einem Teil der Tiere, die Ethanol erhalten hatten, konjugierte Diene nachweisen. Er konnte aber einen Anstieg der Glutathionperoxidaseaktivität in der Leber nachweisen. Dieses Enzym setzt Fettsäurehydroperoxyde um und schützt so die Zelle vor der toxischen Wirkung dieser Substanzen.
Da Ethanol nicht allein hepatotoxisch ist, studierte Reitz (1973) den Einfluß der Ethanolbehandlung auf die Fettsäurezusammensetzung des Rattenherzens. Er fand ein Absinken des Arachidonsäuregehaltes bei gleichzeitigem Anstieg der Gesamtlipidkonzentration. Comporti et al. (1973) konnten zeigen, daß für den Anstieg der Malondialdehydproduktion in Rattenleberhomogenaten ein cytosolischer Faktor verantwortlich ist. Dieser hitzelabile Faktor wurde mit dem Befund in Verbindung gebracht, daß nach Ethanolapplikation der Glutathiongehalt der Leber absinkt. Reitz (1975) behandelte Ratten über einen Monat chronisch mit Ethanol. Die Tiere wiesen danach in ihren Lebermikrosomen einen Abfall der Arachidonsäure und der C_{22}-Polyene sowie eine Vermehrung der NADPH-Oxidation und des Sauerstoffverbrauchs auf. Darauf stützte Reitz die Hypothese, daß der vermehrte Elektronenfluß durch die Elektronentransportkette der Mikrosomen ohne Bereitstellung eines Akzeptors am Cytochrom P-450 zu Lipidperoxidation führen kann. Alternativ könnten auch die Nichthämeisenproteine der mikrosomalen Elektronentransportkette für die Entstehung der Lipidperoxidation verantwortlich sein.

Daß nicht Ethanol selbst, sondern sein Metabolit Acetaldehyd für die durch Ethanolzusatz zu Leberhomogenaten hervor-

gerufene Malondialdehydproduktion verantwortlich ist, konnte Stege et al. (1977) zeigen. Inkubation in Gegenwart von Pyrazol, das die Alkoholdehydrogenase hemmt, führt nicht zu einer Erhöhung der Malondialdehydproduktion durch Ethanol. Zusatz von Acetaldehyd zu Leberhomogenaten führt zu Malondialdehydbildung, die durch Glutathion vollständig verhindert werden kann.

Einen weiteren Eingriff in die intrahepatischen Schutzmechanismen gegen oxidative Angriffe nach Ethanolapplikation zeigten Valenzuela et al. (1980). Diese Autoren berichteten, daß bereits nach einmaliger Ethanolgabe die Konzentration an konjugierten Dienen und die Aktivität der NADPH-Oxidase in der Leber von Ratten vergrößert waren. Zusätzlich fanden sie einen Anstieg der Superoxiddismutase um 40 Prozent als Hinweis für die Adaption des Organs an peroxidative Prozesse.

Die meisten Befunde der Lipidperoxidation wurden durch Bestimmung von Meßgrößen in vitro oder post mortem erhoben. Inzwischen wurde jedoch eine Methode entwickelt, die es gestattet, nichtinvasiv tatsächliche in vivo Ergebnisse über Lipidperoxidation zu erhalten. Gestützt auf die Untersuchungen von Horvat et al. (1964), der die Entstehung von kurzkettigen gesättigten Kohlenwasserstoffen bei der Peroxidation von Methyllinoleat beobachtet hatte, und die Befunde von Donovan und Menzel (1978), die die Pentanentwicklung aus peroxidierter Linolensäure verfolgt haben sowie die Berichte von Dumelin und Tappel (1977), die zeigten, daß Fettsäurehydroperoxyde erst durch Katalyse mit Eisen- oder Kupferkomplexen zu Kohlenwasserstoffen zerlegt werden, kann davon ausgegangen werden, daß in der Atemluft von Labortieren und Menschen aufgefundene kurzkettige Kohlenwasserstoffe ein Indikator für eine im Organismus ablaufende Lipidperoxidation sind.
Als Ursache für das Auftreten von Ethylen in der Atemluft von Labortieren werden zwei Mechanismen diskutiert: Lie-

berman und Mapson (1964) konnten die gleichzeitige Produktion von Ethan und Ethylen bei der Peroxidation von Linolensäure in Gegenwart von Kupferionen und Ascorbat bestimmen. Auch bei der Inkubation von Mikrosomen in Gegenwart von NADPH und Kupferionen kam es zu einer Ethylenfreisetzung. Diese trat parallel zum Anstieg der Malondialdehydkonzentration auf (Lieberman und Hochstein, 1966). Daraus konnte die Hypothese abgeleitet werden, daß Ethylen als Spaltprodukt mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei der Lipidperoxidation auftritt. Alternativ kann Ethylen aber auch beim Kupfer-katalysierten oxidativen Abbau von Methionin über die Zwischenstufe Methional entstehen (Lieberman et al., 1965). Beauchamp und Fridovich (1970) fanden, daß für die Methionalzerstörung OH-Radikale verantwortlich sind.

Andere Meßparameter, die für die Bestimmung der Lipidperoxidation zur Verfügung stehen, sind: Malondialdehydbestimmung durch Reaktion dieses Spaltprodukts mit Thiobarbitursäure und photometrische Bestimmung des dabei gebildeten Farbstoffes. Dieser Test hat mehrere Nachteile. Er ist unspezifisch, da außer Malondialdehyd auch andere Gewebsaldehyde und Zucker mit Thiobarbitursäure rote Farbstoffe bilden (Slater, 1972). In vivo ist die Malondialdehydbestimmung nur begrenzt anwendbar, da Malondialdehyd im Gewebe als hochreaktive Substanz, die an Proteine binden kann (Tappel, 1980), schnell metabolisiert wird (Recknagel, 1967a). Bei der Reaktion von Malondialdehyd mit den freien Aminogruppen entstehen fluoreszierende Produkte (Tappel, 1980). Die Chemie dieser Reaktion ist noch nicht aufgeklärt, so daß eine quantitative Auswertung der Meßergebnisse nicht möglich ist (Logani und Davies, 1980). Die jodometrische Titration der freien Fettsäurehydroperoxyde ist nur bei in vitro Untersuchungen anwendbar, da diese Verbindungen in vivo rasch zerfallen oder enzymatisch abgebaut werden (Logani und Davies, 1980). Bei der Lipidperoxidation entstehen Verbindungen mit konjugierten Dienen

(Recknagel und Goshal, 1966a). Die Messung der Dienkonjugation wird deshalb häufig für in vitro und in vivo Untersuchungen herangezogen, obwohl diese Methode unspezifisch ist und die Extinktionskoeffizienten dieser im ultravioletten Bereich absorbierenden Substanzen für biologische Proben nur grobe Näherungswerte darstellen (Logani und Davies, 1980). Bei allen oben genannten Methoden müssen die bei der Untersuchung verwendeten Tiere getötet werden. Meistens schließt sich dann noch eine aufwendige Extraktion der zu bestimmenden Substanzen an (Plaa und Witschi, 1976).

Die Bestimmung der Kohlenwasserstoffe in der Atemluft von Labortier und Mensch stellt dagegen eine methodisch einfachere, nichtinvasive Meßanordnung dar, die die kontinuierliche Überwachung auch über längere Zeiträume erlaubt. Riely et al. (1974) benutzten die Ethanentwicklung zur Bestimmung der Lipidperoxidation durch CCl_4 in vivo und korrelierten das Ausmaß der Ethanproduktion mit der Malondialdehydentstehung in vitro. Hafeman und Hoekstra (1977a/b) bestimmten Ethan in vivo als Maß für die durch Vitamin E-Mangel und Selenmangel hervorgerufene Lipidperoxidation sowie die Schutzwirkung von Vitamin E, Selen und Methionin gegenüber der CCl_4 ausgelösten Lipidperoxidation bei Ratten. Dillard et al. (1977) zeigten, daß Ratten, die Vitamin E-armes Futter erhalten hatten, neben Ethan auch vermehrt n-Pentan abatmeten. Köster et al. (1977) zeigten vermehrte Ethanabatmung bei Ratten, die CCl_4 oder Ethanol erhalten hatten. Lindström und Anders konnten zeigen, daß die durch CCl_4-Behandlung hervorgerufene Ethanabatmung durch Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital verstärkt, durch Vorbehandlung mit Methylcholanthren aber vermindert wird. Litov et al. (1978) zeigten, daß Ratten nur dann vermehrt n-Pentan nach einer akuten Ethanolgabe abatmeten, wenn sie zuvor mit einer Vitamin E-armen Diät ernährt worden waren. Sagai und Tappel (1978) konnten zeigen, daß Ratten mit einem Mangel an Vitamin E nach CCl_4-Intoxikation mehr n-Pentan abatmen. Dabei war das Ausmaß der Kohlenwas-

serstoffabatmung abhängig von der applizierten CCl_4-Dosis. Vermehrte Ethanentwicklung durch Ratten wurde nach der Applikation von einer Reihe chlorierter Lösungsmittel beobachtet (Köster et al., 1978). Dabei traten Differenzen zwischen dem Ausmaß der in vivo beobachteten Ethanabatmung und den in vitro bestimmten Malondialdehydwerten auf. Sagai und Tappel (1979) untersuchten halogenierte Methane auf ihre Fähigkeit, die n-Pentanabatmung zu stimulieren. Sie fanden, daß CCl_4 und Bromtrichlormethan am wirksamsten waren. Die n-Pentanwerte korrelierten sehr gut mit dem durch diese Verbindungen bewirkten Anstieg konjugierter Diene in den Lebern der Versuchstiere. Neben halogenierten Methanen wurden aber auch andere hepatotoxische Verbindungen auf ihre Fähigkeit, die Kohlenwasserstoffproduktion von Labortieren in vivo zu stimulieren, untersucht. So konnten Wendel et al. (1979) eine dramatische Ethanproduktion bei Mäusen provozieren, wenn sie die Tiere nach einer Fastperiode mit Paracetamol behandelten.
Abb. 1.4. zeigt den Mechanismus der Entstehung von Kohlenwasserstoffen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Durch die Lipidperoxidation werden nicht nur die Morphologie und die Funktion biologischer Membranen zerstört. Es entstehen dabei äußerst toxische Produkte. Fettsäurehydroperoxyde haben niedrige LD_{50}-Werte (Recknagel et al., 1977). Malondialdehyd ist mutagen (Mukai und Goldstein, 1976). Daneben werden auch bisher nicht identifizierte Verbindungen gebildet, die Paramecien töten und die Lyse von Erythrocyten bewirken können (Recknagel und Turocy, 1977; Willis et al., 1977).

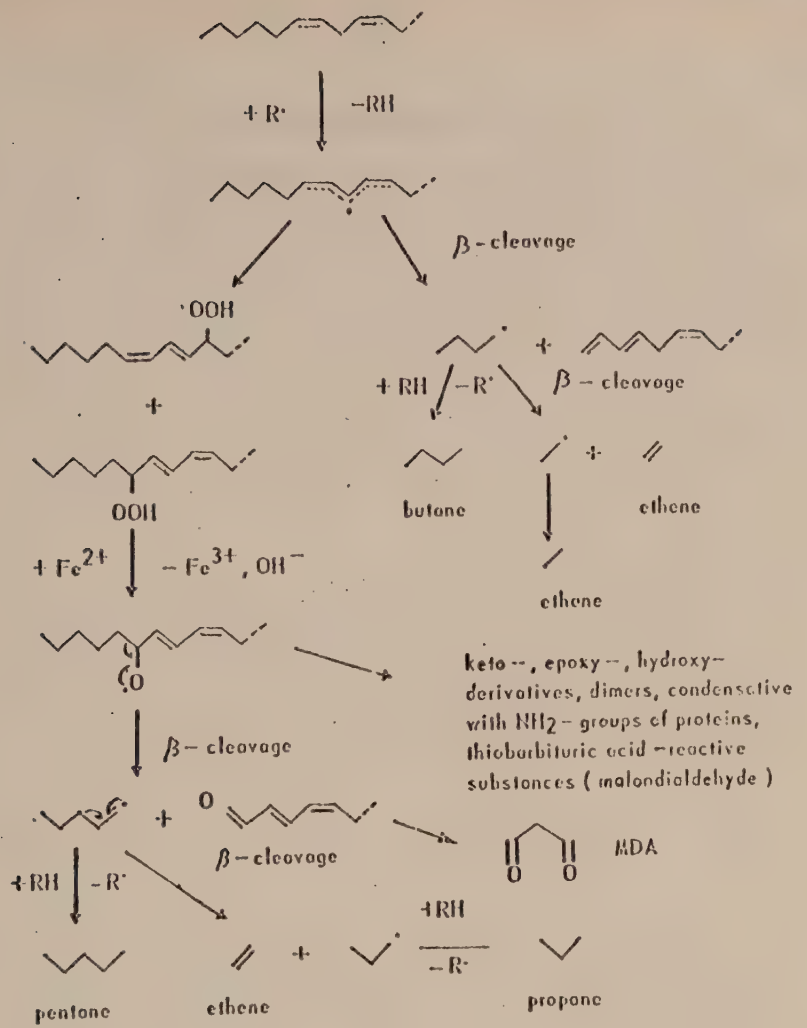


Abbildung 1.4.: Reaktionsschema für den Radikal-induzierten peroxidativen Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren (nach Frank et al., 1980)

1.4. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Da in der Diskussion der letzten Jahre die Frage stand, ob Ethanol die Lipidperoxidation begünstigt und auf diesem Wege zur Schädigung von Zellen beiträgt, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Hypothese erneut überprüft. Durch Anwendung einer neuen nichtinvasiven Methode, nämlich der Bestimmung von flüchtigen Kohlenwasserstoffen in der Atemluft, war es möglich, wahre in vivo Versuche durchzuführen. Geeignete in vitro Modelle wurden ebenfalls verwendet, um ein vollständigeres Bild zu erhalten. Als Vergleichssubstanz wurde jeweils das Prooxidans Bromtrichlormethan eingesetzt.

Da sich herausstellte, daß bei in vivo Versuchen mit einer Reinhalation der produzierten Kohlenwasserstoffe mit anschließender Metabolisierung zu rechnen war, wurde weiterhin die Clearance kurzkettiger Kohlenwasserstoffe aus dem Gasraum eines statischen Expositionssystems durch Labortiere in vivo untersucht. Dies ist deshalb notwendig, da erst die Kenntnis der Metabolisierungsrate der Alkane Rückschlüsse auf das tatsächliche Ausmaß der Lipidperoxidation zuläßt.

Bei einigen Versuchen atmeten chronisch Ethanol trinkende Ratten ungewöhnlich hohe Mengen eines Gases ab, das als Methan identifiziert werden konnte. Daher wurde der Frage nachgegangen, ob die Freisetzung dieses Gases in Zusammenhang mit der chronischen Alkoholwirkung steht.

2. Methoden

2.1. Methodik der isoliert perfundierten Leber

Tiere : Lebern wurden von männlichen Ratten (Wistar, 240-260g Körpergewicht, Fa. Ivanovas, Kissleg, BRD) gewonnen.
Die Tiere wurden 24 h vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten, erhielten aber Trinkwasser ad libitum.

Lösungen: 1. Krebs-Ringer-Bikarbonat (KRB), pH 7,4:

1 l	0,9 % NaCl
210ml	1,3 % $NaHCO_3$
40ml	1;15% KCl
30ml	1,62% $CaCl \times 2\ H_2O$
10ml	2,11% KH_2PO_4
10ml	3,82% $MgSO_4 \times 7\ H_2O$

Diese Lösung wird vor Verwendung 20 Minuten Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) begast.

2. Heparin-Lösung für Rinderblut:
250g Heparin (Serva) auf 250ml KRB

3. Ringer-Lösung zum Waschen der Erythrozyten:

9 g	NaCl
0,42g	KCl
0,25g	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$

auf 1000ml mit H_2O bidest. auffüllen.

4. Perfusionslösung während der Präparation:
150mg Heparin in 300ml KRB

5. Perfusionslösung während des Versuchs:
1 Teil gewaschene Erythrozyten (Gewicht/Volumen) mit 3 Teilen Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (mit 0,44g $NaHCO_3$, 200mg Heparin und 4g Rinderserumalbumin versetzt).

2.1.1. Präparation der Erythrozyten:

Maximal drei Tage altes heparinisiertes Rinderblut von jungen Bullen wird drei Minuten bei 3.000g in gewogenen Zentrifugenbechern im Ausschwingrotor zentrifugiert. Überstand (Plasma) sowie die Leukozyten (fluffy layer) werden abgesaugt und verworfen. Dann werden die Erythrozyten in Ringerlösung aufgenommen und nach vorsichtigem Mischen mit dem Spatel erneut zentrifugiert. Der Überstand und eventuell noch vorhandene Leukozyten werden wie oben abgesaugt. Nach einem dritten Waschgang werden die Erythrozyten 1:3 (Gewicht/Volumen) mit Eagle's MEM versetzt. 150ml dieses Perfusionsmediums werden vor Versuchsbeginn in der Perfusionsanlage unter Umpumpen auf 37°C temperiert. Gleichzeitig wird die Perfusionsanlage mit einer kohlenwasserstofffreien Gasmischung (synthetische Luft mit 5% CO_2 versetzt) langsam durchgespült, um eventuell vorhandene Kohlenwasserstoffreste auszutreiben.

2.1.2. Die Perfusionsanlage:

Zur Perfusion wurde ein Glaskugeloxygenatorsystem nach Miller (Miller et al., 1951) verwendet (siehe Abb. 2.1.). Gegenüber dem Original wurden folgende Veränderungen vorgenommen: Analog zu den in vivo Versuchen wurde das System nicht mit Gasgemisch durchströmt, sondern nach Abnahme der 1. Gasprobe zu Beginn des Experiments nur verbrauchter Sauerstoff nachgeliefert. Die Anlage wurde weitestgehend aus Glas hergestellt.
Kunststoffschläuche wurden nur zum Betrieb der peristaltischen Pumpe und als kurze Kupplungen zwischen Glasrohren verwendet, um Absorptionsphänomene zu vermeiden. Das Innenvolumen betrug 650ml, so daß der verbleibende Gasraum nach Beschickung mit Leber und Perfusionslösung dem des Exsikkators bei den in vivo Versuchen entsprach.

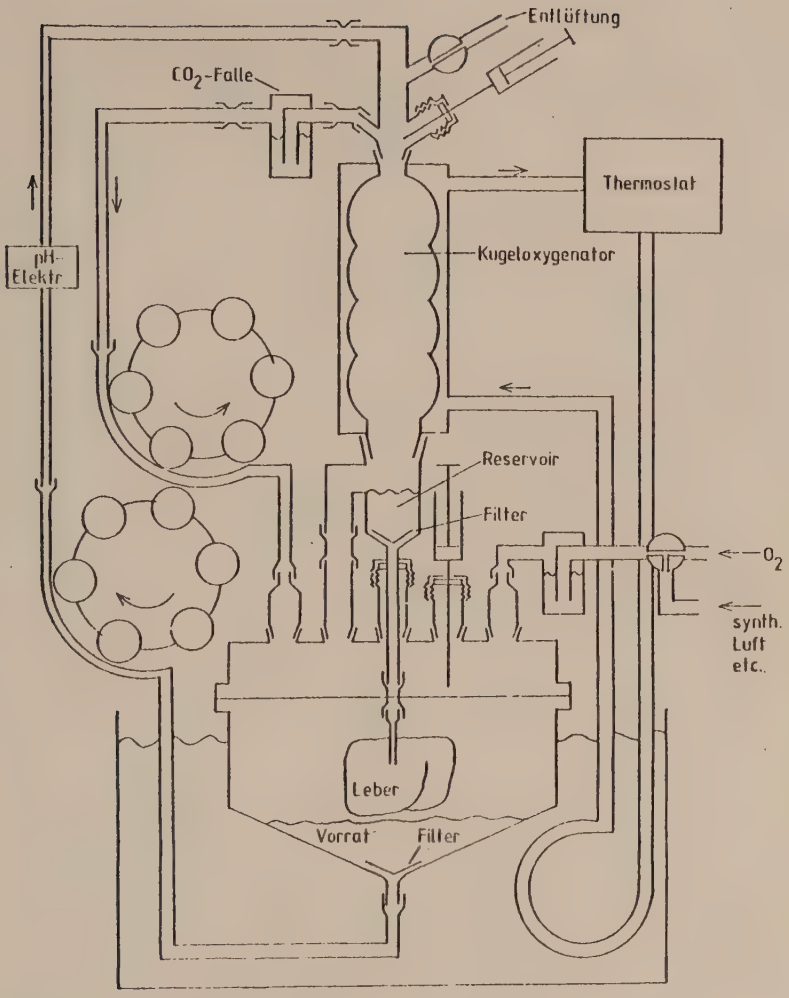


Abbildung 2.1.: Schema der gasdichten Perfusionsanlage, die für die Untersuchungen mit der isolierten Rattenleber verwendet wurde.

Im Detail setzte sich die Perfusionsanlage aus folgenden Bestandteilen zusammen:
Der Boden des Leberbehälters diente als Vorratsgefäß für das Perfusionsmedium. An der tiefsten Stelle befand sich unter einem Filter aus Seidengewebe, der mit Hilfe eines Glasrings fixiert war, der Abfluß, der mit der peristaltischen Pumpe verbunden war. Der Deckel des Leberbehälters enthielt fünf Schliffbohrungen (NS 14,5) zur Aufnahme der Anschlüsse für die Gasversorgung, die Gaszirkulation, den Überlauf für das Perfusionsmedium, das Septum für die Gasprobenentnahme (PTFE-beschichtetes Gummi in einer Quick-Fit-Schraubfassung) und einen weiteren Quick-Fit-Anschluß, durch den der Überlauf des den hydrostatischen Druck (20 cm Wassersäule) über der Leber konstant haltenden Reservoirs hindurchgeführt wurde. Der Boden dieses Reservoirs enthielt ebenfalls einen mit einem Glasring fixierten Seidenfilter, durch den das Perfusionsmedium in die am unteren Ende des Reservoirs fixierte Kanüle strömte, die die Leber versorgte und an der die Leber im Leberbehälter aufgehängt war.
Über dem Reservoir war über einen Glasschliff (NS 29) der thermostasierte Kugeloxygenator mit vier Kugeln angeschlossen, darüber über einen NS-14,5-Glasschliff ein Verbindungsstück mit Entlüftungsventil, Ansatz für die Zirkulation des Perfusionsmediums, Septum zur Injektion von Testsubstanzen (PTFE-beschichtetes Gummi in Quick-Fit-Schraubfassung) und Auslaß zur CO_2-Falle (ein mit KOH gefülltes Gärröhrchen), über die das Gasgemisch zur Pumpe gelangte.
Der Weg des Gasgemisches lief vom Gasraum des Leberbehälters über den Überlauf, den Kugeloxygenator und die CO_2-Falle zur Pumpe, der Weg des Perfusionsmediums vom Vorrat am Boden des Leberbehälters über die Pumpe, an einer pH-Elektrode vorbei, über das Verbindungsstück, den Kugeloxygenator und das Reservoir und von dort entweder durch den Überlauf oder die Leber zurück in den Leberbehälter. Die peristaltische Pumpe sorgte für eine Fließgeschwindigkeit von 70 ml pro Minute, der Gasraum wurde damit ein-

mal in fünf Minuten, das Perfusionsmedium zweimal pro Minute umgewälzt.
Der Leberbehälter hing in einem thermostasierten Wasserbad. Während der Versuchsdauer wurde die gesamte Perfusionsanlage mit Aluminiumfolie abgedeckt, um Wärmeverluste zu vermeiden und Licht auszuschließen.

2.1.3. Präparation der Leber:

Unter Äthernarkose wird das Abdomen eröffnet. Die Vena porta wird zur Hälfte eingeschnitten und mit einer Braunüle Größe 1 (Braun, Melsungen) kanüliert, die mit zwei Ligaturen eingebunden wird. Danach wird die Leber bis zum Ende der Präparation (maximal fünf Minuten) unter einem Druck von 40ml Wassersäule mit Perfusionslösung gespült. Zum Entbluten des Tieres werden die Aorta abdominals und die Vena cava inferior oberhalb der Vena renalis eröffnet. Danach wird die Leber von Bindegewebe, Magen, Därmen und Zwerchfell freipräpariert und an der Braunüle in die Perfusionsanlage eingehängt.

2.1.4. Perfusion:

Die Leberperfusionsanlage wird zunächst fünf Minuten lang mit kohlenwasserstofffreiem Gasgemisch (19% O_2, 76% N_2 und 5% CO_2 bzw. 5% O_2, 95% N_2 und 5% CO_2) begast, um sie von eventuell während des Einhängens der Leber eingedrungenen Kohlenwasserstoffen zu befreien. Unmittelbar danach wird eine erste Gasprobe (10ml) entnommen und der gaschromatographischen Analyse zugeführt. Eine gleichgroße Menge kohlenwasserstofffreies Gasgemisch wird zur Vermeidung von Druckdifferenzen nachgeliefert. Die Leber selbst wird nun eine Stunde lang ohne weitere Manipulationen an die Anlage adaptiert. Zum Ende dieser Adaptionsperiode wird eben-

falls eine Gasprobe für die Kohlenwasserstoffbestimmung entnommen.
Das Perfusionssystem wird vor der Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle, 33% Äthanol in physiologischer Kochsalzlösung (100mM im Perfusat) oder Bromtrichlormethan (1mM im Perfusat)erneut gespült. Danach erfolgt eine weitere Gasprobenahme, eine weitere 60 Minuten nach Zusatz.

2.2. Präparation von Leberzellen

2.2.1. Tiere:

Leberzellen wurden von männlichen und weiblichen Ratten (Ivanovas, Kisslegg, Körpergwicht 200-350 g) gewonnen. Kontrolltiere erhielten Standarddiät (Altromin C 1000 bzw. C 1320) als Futter und Trinkwasser ad libitum. Ethanolvorbehandlung erfolgte durch Verabreichung einer Ethanol--Glucose-Lösung (20 + 10% in Leitungswasser) bzw. Ethanol--Saccharose-Lösung (20 + 10% in Leitungswasser) als Trinkflüssigkeit für 7 - 9 Wochen. Als Kontrolle zu dieser chronischen Ethanolbelastung erhielten andere Tiergruppen isocalorische Glucose- bzw. Saccharoselösung (je 36,9% w/v in Leitungswasser).
Weitere Tiergruppen erhielten für je 12 - 14 Wochen die Vitamin-E-Mangeldiät Altromin C 1018 und als Trinkflüssigkeit entweder Ethanol-Lösung (20% v/v und 0,25% w/v Saccharin in Leitungswasser) oder die dazu isokalorische Saccharose-Lösung (26,9% w/v in Leitungswasser).
Akute Ethanolintoxikation erfolgte durch perorale Verabreichung einer 33%igen Ethanollösung (v/v in physiologischer Kochsalzlösung; 1,8 ml pro 100 g Körpergewicht entsprechend 5 g Ethanol pro kg Körpergewicht) mit Hilfe einer Schlundsonde 12 und 36 Stunden vor der Schlachtung.
Alle Tiere wurden 24 Stunden vor Beginn des Experiments nüchtern gesetzt, Trinkwasser erhielten sie in diesem Zeitraum ad libitum.

2.2.2. Lösungen:

1. Perfusionsmedium 1

Für die Perfusion der Leber während der Präparation wurde folgendes Medium (Baur, 1972) verwendet:

121	mM NaCl	(14,14 g)
6	mM KCl	(894,72 mg)
0,6	mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	(292,18 mg)
12	mM $NaHCO_3$	(2,016 g)
0,74	mM KH_2PO_4	(201,42 mg)
5	mM Glucose	(1,9817 g)
13,2	mg Heparin	

ad 2 l bidestilliertes Wasser.

Das Medium wurde vor Versuchsbeginn im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) begast, um einen pH von 7,2 zu erhalten.

2. Perfusionsmedium 2

Nach fünf Minuten mit Perfusionsmedium 1 wurde die Leber mit Perfusionsmedium 2 perfundiert, dessen Zusammensetzung der von Perfusionsmedium 1 entsprach, außer, daß es mit $CaCl_2$ (0,5 mM) versetzt worden war.

3. Isolationsmedium (Högberg et al., 1973)

120	mg Collagenase (Reinheitsgrad 2, Böhringer)	
0,5	mM $CaCl_2$	(7,36 mg)
2	mM Pyruvat	(22 mg)
480	mg HEPES	

ad 100 ml in Perfusionsmedium 1, pH 7,4.

Auch das Isolationsmedium wurde vor Versuchsbeginn auf 37°C erwärmt und mit Carbogen begast.

4. Waschmedium (Baur, 1972)

131	mM NaCl	(7,66 g)
5,2	mM KCL	(387,73 mg)
0,9	mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	(219,13 mg)
0,12	mM $CaCl_2 \times 2\ H_2O$	(17,64 mg)
5	mM Glucose	(990,85 mg)

ad 1 l mit 3 mM Phosphatpuffer (684,69 mg wasserfreies K_2HPO_4 und 408,27 mg KH_2PO_4, pH 7,4).

Das Waschmedium wurde eisgekühlt verwendet.

5. Inkubationsmedium

Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (Fertiglösung ohne Phenolrotindikator, die bei -20°C gelagert wurde), wurde nach Auftauen am Versuchstag mit folgendem komplettiert:

120 mg HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-2--ethan-sulfonsäure)
500 mg Rinderserumalbumin (Behringwerke)
1,5 mg Penicillin-Na (Hoechst)
ad 25 ml Fertiglösung.

Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

2.2.3. Isolierung der Leberzellen

Das gesamte Verfahren zur Isolierung von Hepatozyten wurde nach der Methode von Berry und Friend (1969) in der Modifikation von Baur et al. (1975) unter Verwendung einiger Anregungen von Högberg et al. (1973) durchgeführt. Unter Äthernarkose wurde das Abdomen der Ratten eröffnet. Zunächst wurde die Vena cava inferior aufgesucht und zwischen den Einmündungen von Vena renalis und Vena hepatica mit einer losen Ligatur versehen. Dann wurde die Vena porta freipräpariert und mit zwei losen Ligaturen umschlungen. Anschließend wurde sie nach partieller Incision mit einer Braunüle Größe 1 (Braun, Melsungen) kanüliert, über die die Leber mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zuerst fünf Minuten mit dem Calzium-freien Perfusionsmedium 1 und dann weiter bis zum Umschalten auf das collagenasehaltige Isolationsmedium mit dem Calzium-haltigen Perfusionsmedium 2 mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 40 ml pro Minute durchspült wurde. Gleichzeitig wurde die Aorta

abdominalis eröffnet, so daß die Ratte entblutet werden konnte. Die Braunüle in der Vena cava wurde mit Hilfe der zwei Ligaturen fixiert. Nun wurde der Thoraxraum eröffnet und der hyperphrenische Teil der Vena cava inferior von den Lungenflügeln freipräpariert. Nach partieller Incision kurz vor dem rechten Atrium wurde diese ebenfalls mit einer Braunüle (Größe 1) kanüliert, die mit zwei Ligaturen fixiert wurde. Nun wurde die Ligatur um die hypophrenische Vena cava inferior zugezogen, so daß das Perfusionsmedium nur noch durch die Leber und die zweite Kanüle strömen konnte. Anschließend wurde die rechte Niere entfernt. Die Leber wurde nun zusammen mit den kanülierten Teilen der Vena porta und der Vena cava inferior von Därmen, Magen, Mesenterium, Diaphragma und Herz freipräpariert. Das Perfusionsmedium 2 wurde durch Isolationsmedium ersetzt, die Leber aus der Ratte entfernt und auf einer Lochplatte über dem Vorratsbehälter des Isolationsmediums rezirkulierend mit 25 ml Isolationsmedium mit steigender Durchflußgeschwindigkeit perfundiert:

5 Minuten mit 40 ml pro Minute
5 Minuten mit 50 ml pro Minute
5 Minuten mit 60 ml pro Minute

Während dieser Zeit wurde die Leber mit Hilfe einer Lampe erwärmt, zur Erhaltung der Luftfeuchtigkeit wurde sie mit einer Glasschale abgedeckt. Zum Schluß wurde die Leber mit der Schere zerkleinert und mit 25 ml neuem Isolationsmedium in einem Erlenmeyerkolben im Wasserbad unter Carbogenbegasung geschüttelt, um nichtvitale Zellen zu entfernen. Nach dieser 20-minütigen Collagenasebehandlung war die Leber weitestgehend verdaut. Die Hepatozytensuspension wurde durch Filtration durch ein feines Seidentuch von den unverdauten Resten abgetrennt, Abtrennung vom Collagenasemedium erfolgte durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (50 x g, 2 Minuten) und dreimalige Resuspension im Waschmedium mit jeweils erneuter Zentrifugation.

Zuletzt wurden die Zellen in soviel Waschmedium resuspendiert, daß der Proteingehalt der Suspension bei 30 - 60 mg pro Milliliter lag.
Sie wurden im Eisbad aufbewahrt.

2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Die durch die Isolationsmethode gewonnene Zellsuspension wird 1:20 mit Waschmedium verdünnt. Diese Verdünnung wird in eine Zählkammer nach Neubauer eingefüllt. Unter dem Mikroskop werden bei 100-facher Vergrößerung wie sonst bei der Leukozytenzählung die vier großen Eckquadrate ausgezählt. Ist n die Zahl der Hepatozyten in den vier Eckquadraten, so ergibt sich die Gesamtzahl der Zellen pro Milliliter über die Formel:

Verdünnung x n x 10 x 1000 = Zahl pro ml Suspension

2.2.5. Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951)

Die Zellsuspension wurde unter Zusatz von 50 Mikrolitern 1n NaOH 1:500 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Zu 0,5 Millilitern dieser Verdünnung wurden 0,5 Milliliter 1n NaOH und 5 Milliliter alkalisches Kupferreagenz zugesetzt. Nach zehn Minuten wurden 0,5 Milliliter Phenolreagenz (Merck, unmittelbar vor der Verwendung 1:1 aus der Stammlösung mit bidestilliertem Wasser verdünnt) zu dem Ansatz zupipettiert. Nach weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion des entstandenen blauen Farbstoffes bei 720 nm gegen einen Reagentienleerwert bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte gegen eine Eichkurve, die aus Rinderserumalbumin (Fraktion V, Behring-Werke) hergestellt wurde.

2.2.6. Bestimmung der Vitalität der Zellen

2.2.6.1. Trypanblauexklusion

Der Farbstoff Trypanblau, chemische Bezeichnung (3,3'-dimethyl-diphenyl)-4,4'-bis-(azo-2)-8-aminophenol-(1)-disulfonsäure-(3,6), kann die Cytoplasmamembran intakter Zellen nicht passieren. Erst wenn die Oberflächenladung durch Energiemangel absinkt, kommt es zum Eindringen, und der Farbstoff kann unter dem Mikroskop im Zellinneren beobachtet werden (Kaltenbach et al., 1958).
1:20 mit Waschemdium verdünnte Zellsuspension wird mit Trypanblau (0,4% in 0,9% NaCl) zu gleichen Teilen vermischt. Ein Tropfen dieser Mischung wird auf einem Objektträger unter einem Deckelgläschen unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurden jeweils mindestens 200 Zellen auf Trypanblauinhalt untersucht, um den prozentualen Anteil geschädigter Zellen zu bestimmen.

2.2.6.2. Lactatdehydrogenase (Bergmeyer und Bernt, 1974)

0,5 Milliliter des Inkubationsansatzes wurden in einem Eppendorfgefäß 3 Minuten lang bei 1000 x g zentrifugiert. Die Aktivität der Lactatdehydrogenase im Überstand (entspricht dem während der Inkubationsdauer ausgetretenen Anteil) wurde nach folgender Reaktion bestimmt:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactat} + \text{NAD}$$

Die Abnahme von NADH nach Pyruvatzusatz wurde mit Hilfe eines Eppendorf-Filterphotometers mit angeschlossenem Schreiber bei 366 nm bestimmt. Ein Extinktionskoeffizient von 3,3 cm^2 pro Mikromol wurde zugrunde gelegt.
Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurden 0,2 Milliliter des Inkubationsansatzes zu 0,2 Milliliter Triton-X-100-Lösung (10%) pipettiert, mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend wie oben bestimmt.

2.2.6.3. Glutamatdehydrogenase (Schmidt, 1974)

Die Probenentnahme und Aufbereitung erfolgte wie für die Lactatdehydrogenase. Die Enzymaktivität wurde durch folgende Reaktion bestimmt:

$$NH_3 + \alpha\text{-Ketoglutarat} + NADH \xrightarrow{GIDH} L\text{-Glutamat} + NAD + H_2O$$

Als Meßgröße diente wie bei der Lactatdehydrogenasebestimmung die Abnahme der Extinktion des NADH bei 366 nm.

2.2.6.4. Bestimmung des Glutathiongehaltes

Zur Bestimmung des Gehaltes der Leberzellen an reduziertem Glutathion wurde eine modifizierte fluorimetrische Methode nach Hissin und Hilf (1976) verwendet.
0,5 Milliliter Inkubationsansatz (entsprechend 15 mg Feuchtgewicht von Hepatozyten bzw. 1,5 mg hepatozellulärem Protein) wurden drei Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit 7,5 Millilitern Natriumphosphat--EDTA-Puffer (0,1 M Phosphat + 5 mM EDTA, pH 8) und zwei Milliliter Trichloressigsäure (25%) in einem eisgekühlten Homogenisator nach Potter homogenisiert. 1 Milliliter dieses Homogenates wurde 30 Minuten bei 20.000 x g in der Kühlzentrifuge (Sorvall) zentrifugiert. Vom erhaltenen Überstand wurden 0,1 Milliliter mit 1,3 Milliliter Natriumphosphat-EDTA-Puffer gut vermischt. 100 Mikroliter o-Phtaldialdehyd (1mg/ml in Methanol) wurden 15 Minuten vor der Messung zugefügt. Der Ansatz wurde nun bis zur Messung bei 25°C unter Lichtabschluß gehalten. Die Messung selbst erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 350 nm in einem Fluorimeter Typ Aminco-Bowman, die Fluoreszenz wurde bei 420 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit reduziertem Glutathion (Böhringer) hergestellt wurde.

2.2.7. Lipidperoxidation in Leberzellen

2.2.7.1. Malondialdehydbestimmung

Das Ausmaß der Lipidperoxidation bei Hepatozyten- und Mikrosomenversuchen wurde durch Quantifizierung des Reaktionsproduktes Malondialdehyd verfolgt. Es kam die Thiobarbitursäuremethode nach Smuckler et al. (1967) in der Modifikation von Reiner et al. (1972) zur Anwendung: 0,5 Milliliter des Inkubationsansatzes wurden mit 1,0 Milliliter Trichloressigsäure (15%) enteiweißt. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge (5 Minuten bei 1000 x g) wurden 1,0 Milliliter Überstand mit 0,5 Milliliter Thiobarbitursäure versetzt und nach Schütteln 10 Minuten im kochenden Wasserbad entwickelt. Nach dem Abkühlen wurde der rote Farbstoff bei 535 nm gegen einen Reagentienleerwert bestimmt. Die Konzentration wurde mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt, die mit Malondialdehyddiethyldiacetal erstellt worden war. Zugabe von Rinderserumalbumin, nichtperoxidierten Mikrosomen bzw. nichtperoxidierten Hepatozyten zu Malondialdehyddiethyldiacetal führte zu identischen Eichkurven.
Da bei den Versuchen immer die gleiche Proteinkonzentration vorlag (1mg Protein entsprach 2,5 x 10^6 Zellen) wurden die Ergebnisse als Extinktion bei 535 nm angegeben. Zur Umrechnung auf µmol Malondialdehyd pro Milligramm Protein kann der aus der Eichkurve gewonnene Faktor 11,1 verwendet werden.

2.2.7.2. Auslösung der Lipidperoxidation (Inkubationsmethode)

Die Inkubation wurde in 25 ml - Erlenmeyerkolben durchgeführt, die in einem Wasserbad bei 37°C unter freiem Zutritt von Raumluft mit einer Frequenz von 45 Schwingungen pro Minute geschüttelt wurden. Die Hepatozytensuspension wurde mit Inkubationsmedium auf einen Proteingehalt von

3 mg pro Milliliter verdünnt. Nach einer Adaptionsphase von 5 Minuten wurde durch Zusatz der Testsubstanzen mit dem Experiment begonnen. Unmittelbar danach sowie nach den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten, wurden Proben zur Bestimmung von Malondialdehyd, Glutathion und freigesetzter Enzyme abgenommen.
Lipidperoxidation wurde durch Zusatz von Bromtrichlormethan ausgelöst.
Acetaldehyd und Ethanol entweder allein oder in Kombination mit Bromtrichlormethan eingesetzt.

2.3. Präparation von Rattenlebermikrosomen

Rattenlebermikrosomen wurden nach der Methode von Remmer et al. (1967) präpariert. Dazu wurden männliche Sprague-Dawley Ratten, die zum Teil chronisch mit Ethanol vorbehandelt waren, 24 Stunden nüchtern gehalten, worauf die Tötung durch cervikale Dislokation folgte. Die Tiere wurden zum Ausbluten dekapitiert. Nach Eröffnung des Abdomens wurde die Leber exzidiert und sofort in eiskalte Tris-KCl-Lösung (4 Teile KCl 0,15 M und 1 Teil Tris-HCl 0,25 M; pH 7,5) überführt. Anschließend wurde die Leber in neuer Tris-KCl-Lösung (5 Teile Lösung pro Gramm Leber) mit der Schere zerkleinert. Die so entstandene Suspension wurde unter Eiskühlung im Potter-Homogenisator homogenisiert und danach 10 Minuten lang bei 10.000 x g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach Entfernung der oben schwimmenden Fettschicht 60 Minuten in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde erneut in Tris-KCl-Lösung aufgenommen und noch einmal 60 Minuten lang bei 100.000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in soviel Tris-KCl-Lösung resuspendiert, daß 1 Milliliter Suspension 2,5 mg mikrosomales Protein enthielt.

2.3.1. Auslösung der Lipidperoxidation in Mikrosomeninkubationen

Für alle Experimente wurden Headspace-Gläser (20 ml Volumen) verwendet, die während der Inkubationsdauer mit Teflon-kaschierten Butylgummikappen verschlossen gehalten wurden. Für jeden Zeitwert wurde ein Ansatz verwendet.
Jeder Inkubationsansatz enthielt:

1,0 ml Mikrosomensuspension (7,5 mg Protein pro ml)
2,5 ml Tris-KCl-Lösung

Dieser Ansatz wurde zunächst 5 Minuten lang bei 37°C im Schüttelbad inkubiert und mit kohlenwasserstofffreiem Gasgemisch (synthetische Luft) durchperlt. Anschließend wurde durch Zugabe von 0,5 ml NADPH-Lösung (4,16/ml) oder NADPH--regenerierendem System (NADPH, Na-Isocitrat und Isocitratdehydrogenase) und 1,0 ml Fe/ADP-Lösung (34 µg $FeSO_4$ x 7 H_2O und 4,27 mg ADP pro ml Tris-KCl-Lösung) oder, wenn nur der Einfluß von NADPH bestimmt wurde, durch Zugabe von 1,0 ml Tris-KCl-Lösung die Reaktion gestartet.
Am Ende der Inkubationszeit wurden die Headspace-Gläser auf Zimmertemperatur abgekühlt. Anschließend wurde durch das Butylgummiseptum 1 ml Gasraum aus dem Inkubationsgefäß entnommen und der gaschromatographischen Analyse zugeführt (Direktinjektion auf eine Porasil C-Säule).
0,5 ml des Inkubationsansatzes wurden, wie bereits bei den Hepatozytenversuchen beschrieben, auf Malondialdehydbildung untersucht.

Zur Hemmung von Cytochrom P-450 wurde direkt nach dem Start der Reaktion 30 Sekunden lang eine kohlenwasserstofffreie Gasmischung (90% CO in 10% O_2) in das Inkubationsgefäß eingeleitet.
Weiterhin wurden der Fe-ADP-Lösung als Hemmstoffe zugesetzt:

SKF 525 A (0,1 und 1 mM im Inkubationsansatz)
EDTA (1 mM im Inkubationsansatz).

In einigen Versuchen wurde die Reaktion zuerst normal gestartet und erst nach 30 Minuten durch Zusatz von EDTA (1 mM im Inkubationsansatz) unterbrochen.

2.4. In vivo Experimente

2.4.1. Tiermaterial

Die meisten Experimente wurden mit geschlechtsreifen männlichen und weiblichen Wistar-Ratten, deren Körpergewicht zwischen 180 und 250 g lag, durchgeführt. Zur Klärung der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der beobachteten Ergebnisse wurde eine Versuchsreihe mit noch nicht geschlechtsreifen Tieren beiderlei Geschlechts dieses Stammes (Körpergewicht 80 bis 120 g, Lebensalter 6 bis 8 Wochen) durchgeführt.
Weitere Versuche wurden mit Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts, männlichen NMRI-Mäusen und männlichen Meerschweinchen durchgeführt.
Die Tiere stammten aus der Versuchstierzuchtanstalt Ivanovas, Kisslegg.

2.4.2. Vorbehandlung der Tiere

Alle Tiere wurden nach der Lieferung zunächst mindestens zwei Wochen lang zur Akklimatisierung im Tierhaus des Instituts in klimatisierten Räumen (22°C, 60% relative Luftfeuchtigkeit) mit kontrolliertem Tag-Nacht-Rhythmus (12/12 Stunden) gehalten. Sie erhielten, wenn nicht anderweitig spezifiziert, pelletiertes Festfutter Altromin C 1320 und Trinkwasser ad libitum. Wenn nicht anders beschrieben, wurde den Tieren 24 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen. Sie erhielten aber weiterhin Trinkwasser ad libitum.
Zur Induktion des arzneimittelabbauenden Enzymsystems wurden die Tiere nach Greim et al. (1970) vorbehandelt: Nach einer einmaligen Injektion von Phenobarbital (80 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal) erhielten sie 3 Tage lang Phenobarbital in 0,1%iger Lösung im Trinkwasser. 24 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten sie wieder reines Trinkwasser.
Methylcholanthren erhielten die Tiere einmalig (30 mg

pro kg Körpergewicht intraperitoneal) drei Tage vor Versuchsbeginn.
Zur Erzielung weitestgehend keimfreier Tiere wurde 3 Tage lang mit der Schlundsonde eine Mischung von Streptomycin (Streptothenat^{r}, Hoechst, 100 mg pro kg Körpergewicht) und Sulfaguanidin (Resulfon S^{r}, Nordmark, 200 mg pro kg Körpergewicht) appliziert (Rodkey und Collison, 1977).
Ethanolintoxikation wurde auf zwei Wegen erreicht:
1. akute Ethanolbelastung: Dazu erhielten die Tiere per Schlundsonde 0,5 bis 5 g Ethanol pro kg Körpergewicht als 3,3 bis 33%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung (1,8 ml pro 100 g Körpergewicht) o,5 Stunden vor Versuchsbeginn. Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Kochsalzlösung.
2. chronische Ethanolbelastung: Nach einer Adaptionsphase von 10 Tagen, während der die Trinkflüssigkeit alle zwei Tage mit 2% (v/v) mehr Ethanol versetzt wurde, erhielten die Tiere eine 20%ige Ethanollösung, die mit 0,05% Saccharin versetzt wurde, über einen Zeitraum von 6 bis 10 Wochen. Kontrolltiere zu dieser Tiergruppe erhielten eine zu der Ethanollösung isokalorische Saccharoselösung (26,9%) als Trinkflüssigkeit.
Bromtrichlormethan (Riedel de Haen) wurde mit einer Mikrolitersprítze in Dosen von 25 bis 100 Mikrogramm (1,25 bis 5 Mikroliter pro 100 g Körpergewicht) pro kg Körpergewicht 15 Minuten vor Beginn der Messung intraperitoneal appliziert.
Dithiocarb (Diethyldithiocarbamat, Merck), Tetrahydrofuran (frisch destilliert), SKF-525 A (2-diethylaminoethyl-2, 2-diphenylvalerat x HCl, Smith, Kline & French, Philadelphia, USA) und Metyrapon wurden in Wasser gelöst und jeweils in einer Dosierung von 100 mg pro Körpergewicht intraperitoneal 30 Minuten vor Beginn der Messung appliziert.
Acetaldehyd wurde in Dosen von 300 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal gegeben.
Propandiolbehandlung erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 5 Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht 1 Stunde vor Versuchsbeginn.

2.4.3. Exsikkatorsystem zur Kollektion der Atemgase

Zur Kollektion der abgeatmeten Kohlenwasserstoffe wurden je ein Tier (Ratte und Meerschwein) bzw. vier Tiere (Maus) in ein Ganzglasexsikkatorsystem nach Bolt et al. (1976) in der Modifikation von Köster et al. (1978) mit einem Innenvolumen von 800 Milliliter gesetzt. Am Boden befanden sich 100 g Atemkalk (Drägersorb, Dräger, Lübeck) zur Absorption des von den Tieren produzierten CO_2. Darüber saßen die Tiere auf einer Lochplatte aus Porzellan. Ein mit kohlenwasserstofffreiem Sauerstoff gefülltes Spirometer war mit dem Sauerstoffeinlaß verbunden und lieferte verbrauchten Sauerstoff nach. Gasproben konnten durch ein PTFE-beschichtetes Gummiseptum mit Hilfe einer gasdichten 10 ml Einmalspritze entnommen werden. Durch die Probenahme entstandene Volumenverluste wurden durch Zugabe einer gleichen Menge kohlenwasserstofffreier synthetischer Luft ersetzt (Abb. 2.2.)
Vor der ersten Probenahme wurde das System 5 Minuten lang gründlich mit kohlenwasserstofffreier synthetischer Luft gespült, um die darin befindliche Raumluft, die mit erheblichen Mengen an Kohlenwasserstoffen kontaminiert war, zu entfernen.
Weitere Probenahmen erfolgten zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten, in der Regel jeweils nach 1, 2, 3 und 4 Stunden.

2.4.4. Exsikkatorsystem zur Bestimmung der Aufnahme von Kohlenwasserstoffen

Dies Exsikkatorsystem unterschied sich von dem Kollektionssystem durch folgendes:
Das Volumen betrug 2.600 ml, es wurden pro Exsikkator 2 Ratten oder Meerschweinchen bzw. 10 Mäuse eingesetzt, und die Probenahme erfolgte alle 20 Minuten. Am Boden befanden sich 150 g Atemkalk sowie ein Magnetrührer, der für die Umwälzung des Gasraums sorgte.

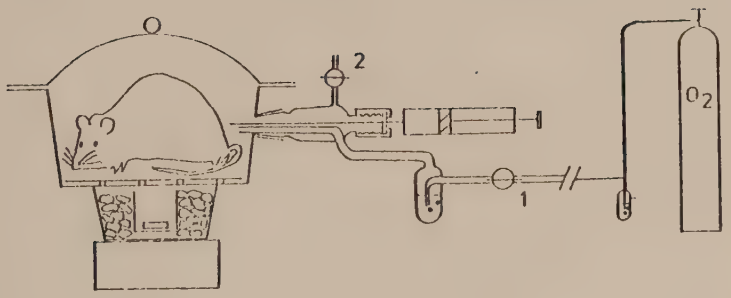


Abbildung 2.2.: Ganzglasexsikkatorsystem zur Kollektion von Atemgasen nach Bolt et al., 1976.

1: Sauerstoffzufuhr
2: Lüftungsventil

2.4.5. Zugabe von Gasen und Gasgemischen in das Exsikkatorsystem

Zur Bestimmung der Aufnahme von Kohlenwasserstoffen durch Labortiere wurden diese in dem vorstehend beschriebenen Exsikkatorsystem, einem statischen Expositionssystem, den respektiven Substanzen ausgesetzt. Wurde die Aufnahme nur einer Substanz geprüft, so wurde diese mit Hilfe einer 10 Milliliter Einmalspritze aus der Vorratsflasche entnommen und mit Hilfe einer 20 Zentimeter langen Kanüle durch das Septum injiziert. Danach wurde zur schnelleren Verteilung im Gasraum das Expositionssystem 10 Mal aspiriert und erneut injiziert. Anschließend wurde mit einer neuen Einmalspritze die erste Gasprobe für die Gaschromatographie entnommen.

Zur Behandlung mit Pentan wurde dieses mit Hilfe einer Einmalspritze aus dem Dampfraum der Vorratsflasche ca.1 Zentimeter über dem Flüssigkeitsspiegel entnommen und wie oben injiziert.

In einigen Versuchen wurden die Tiere mit allen im Eichgasgemisch vorkommenden Kohlenwasserstoffen gleichzeitig behandelt. Dazu wurde in einem Spirometer ein Gemisch aus 20% Sauerstoff und 80% Eichgasgemisch, welches die Kohlenwasserstoffe in Konzentrationen von 0,3 - 0,5 ppm in Stickstoff enthielt, hergestellt. 5 Liter dieses Gemisches wurden mit Hilfe einer an den Entlüftungsstutzen des Expositionssystems angeschlossenen Wasserstrahlpumpe über den Einlaßstutzen innerhalb einer Minute in das System hineingesaugt. Danach wurden die Hähne an Einlaß- und Entlüftungsstutzen geschlossen und die erste Gasprobe gezogen. Über einen Dreiwegehahn wurde sodann ein weiteres Spirometer, das mit kohlenwasserstofffreiem Sauerstoff gefüllt war, angeschlossen, um während des Versuchs von den Tieren verbrauchten Sauerstoff zu ersetzen.

2.4.6. Gaschromatographische Bestimmung von Kohlenwasserstoffen

Zur Bestimmung des Kohlenwasserstoffgehaltes der Gasproben diente ein Gaschromatograph Modell Fractovap 2150 der Firma Carlo Erba (Hofheim). Proben bis zu einem Volumen von 1 Milliliter wurden mit Hilfe einer gasdichten Spritze (Hamilton) direkt durch das Septum injiziert. Größere Probenvolumina von 10 Milliliter wurden mit Hilfe einer 10 Milliliter Plastikeinmalspritze entnommen und über ein Sechswegeeinlaßventil mit 6 Milliliter fassender Probensammelschleife in den Gaschromatographen eingegeben. Dabei dienten die ersten 4 Milliliter zum Ausstoßen von in das Probeneinlaßventil eingedrungenen Verunreinigungen, die restlichen 6 Milliliter verblieben in der Sammelschleife und wurden mit dem Trägergasstrom auf die Säule gespült.
Die Auftrennung (Dillard et al., 1977) wurde zuerst auf einer Glassäule (3 Millimeter Durchmesser, 3 Meter Länge) mit aktiviertem Aluminiumoxid (80 - 100 mesh) mit Hilfe eines Temperaturprogramms durchgeführt: 3 Minuten bei 50°C, Aufheizen mit 30° pro Minute auf 80°C, dort 4 Minuten, dann Weiterheizen mit 30° pro Minute auf 150°, dort 4 Minuten und zum Schluß Aufheizen auf 190°C und nach einer weiteren Minute Abkühlen auf 50°C.
Bei dieser Chromatographieform hielt ein Durchflußregler der Firma WGA (Hofheim) die Trägergasgeschwindigkeit bei 35 Milliliter pro Minute.

Trägergas war Stickstoff, der Flammenionisationsdetektor (250°C) wurde mit Wasserstoff (30 Milliliter pro Minute) und synthetischer Luft (600 Milliliter pro Minute) betrieben.
Wegen der langen Zyklusdauer von 0,5 Stunden pro Analyse und der Tatsache, daß wegen der mit · der Temperatur stark ansteigenden Null-Linie die Empfindlichkeit des Gaschromatographen nicht voll ausgenutzt werden konnte, wurde ein isothermes Auftrennungsverfahren verwendet (Frank

et al., 1980a, 1980b). Die Chromatographie der Gasproben erfolgte bei dieser Methode an Porasil C ; 100 - 120 mesh, (Rouen-Poulenc) in einer Edelstahlsäule (3 mm Durchmesser, 5 Meter Länge) bei 60°C isotherm.
Stickstoff als Trägergas (30 Milliliter pro Minute) wurde vor dem Eintritt in die Säule durch Passieren eines Natriumsulfat-Dekahydrat-Turmes angefeuchtet. Der Flammenionisationsdetektor wurde bei 130°C mit 30 Milliliter Wasserstoff und 500 Milliliter synthetischer Luft pro Minute betrieben. Diese Methode erlaubte die Auftrennung der Kohlenwasserstoffe mit 1 bis 5 Kohlenstoffen nach Molekulargewicht, Wasserstoffsättigung und Isomerie bei den meisten Experimenten. Die Analysenzeit betrug 20 Minuten pro Probe.
Wurden die Tiere bzw. die isoliert perfundierte Leber mit halogenierten Kohlenwasserstoffen behandelt, sammelten sich im Gasraum beträchtliche Mengen der applizierten Substanz wie auch ihrer Metabolite an. Wegen ihrer langen Retentionszeit auf Porasil C von bis zu drei Stunden interferierten sie mit später folgenden Kohlenwasserstoffanalysen. Deshalb wurde noch eine weitere Verbesserung an der isothermen Chromatographiemethode vorgenommen:
Nach 1,3 Metern wurde die Porasilsäule durch ein Rückspülventil unterbrochen. 7 Minuten nach Beginn der Analyse wurde der Weg des Trägergases in diesem Säulenabschnitt umgekehrt und die Verunreinigungen während der verbleibenden Analysenzeit von der Säule gespült. Gleichzeitig wurde der Trägergasdruck für die verbleibenden 3,7 Meter der Säule durch Vorschalten einer identischen, ebenfalls mit Porasil C gefüllten Bremssäule aufrecht erhalten.
Die chronisch mit Ethanol behandelten Ratten atmeten große Mengen an Methan ab, das als Stoffwechselendprodukt der unter dieser Behandlung veränderten mikrobiellen Darmflora anzusehen ist. Die dabei aufgetretenen Methanmengen lagen um drei Zehnerpotenzen höher als die der anderen Kohlenwasserstoffe und überlagerten diese zum Teil vollständig. Deshalb mußte in einer Reihe von Versuchen eine weitere

Auftrennungsmethode benutzt werden, die besonders die kurzkettigen Kohlenwasserstoffe Methan, Ethan und Ethylen trennen und so auch der quantitativen Analyse zugänglich machte:
Die Auftrennung erfolgte hier auf einer Glassäule (3 Millimeter Durchmesser, 3 Meter Länge) mit Porapak Q (80 - 100 mesh) bei 40°C isotherm mit Stickstoff (35 Milliliter pro Minute) als Trägergas.
Der Flammenionisationsdetektor wurde wie oben mit Wasserstoff (30 Milliliter pro Minute) und synthetischer Luft (500 Milliliter pro Minute) bei einer Temperatur von 100°C betrieben.
Die bei den oben beschriebenen Verfahren erhaltenen Chromatogramme wurden entweder auf Kompensationsschreibern (Leeds and Northrop) aufgezeichnet und von Hand ausgewertet oder mit Hilfe eines Hewlett-Packard 3380 S Integrators ausgedruckt und elektronisch integriert. Zur Quantifizierung diente ein Eichgasgemisch, das sämtliche relevanten Kohlenwasserstoffe in einer Konzentration von 0,3 bis 0,5 ppm in Stickstoff enthielt. Es wurde jeden Tag vor Beginn der Experimente zur Überprüfung des Systems injiziert.

2.4.7. Massenspektroskopie

Zur GC/MS-Messung wurde ein Varian MAT 112 Massenspektrometer benutzt, der mit einem Varian Gaschromatographen Typ 1440 gekoppelt war. Das Gerät verfügte über einen FID/MS-Separator, der Flammenionisationsmessung bei gleichzeitiger Massenspektrometrie erlaubte. Der Separator teilte den aus der Säule kommenden Gasstrom im Verhältnis 1:1 auf. Stickstoff (35 Milliliter pro Minute) diente als Trägergas, Wasserstoff (30 Milliliter pro Minute) und synthetische Luft (500 Milliliter pro Minute) betrieben den Flammenionisationsdetektor. Zur gaschromatischen Trennung diente eine mit Porasil C gefüllte Edelstahlsäule (3 mm Innendurchmesser, 5 Meter Länge), die isotherm bei 60°C gehalten

wurde. Injiziert wurde jeweils 1 Milliliter des Gasgemisches aus dem Exsikkatorsystem.
Die Betriebstemperaturen für das Massenspektrometer waren: Separator 180°C, Interface 185°C, Ionenquelle 180°C. Die Ionisationsenergie betrug 80 eV.

3. Pharmakokinetische Analyse

Die Kinetik der Aufnahme und Abgabe der zu untersuchenden kurzkettigen Kohlenwasserstoffe bis zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen Atmosphäre im Exsikkatorsystem und den Versuchstieren sowie die kinetischen Größen der metabolischen Eliminierung ließen sich durch die Messung der Kohlenwasserstoffkonzentration im Gasraum über die Zeit bestimmen. Dabei werden die Gaskonzentrationen bzw. Gasmengen bei den Expositionsversuchen im allgemeinen ppm, der in der technischen und toxikologischen Literatur üblichen Maßeinheit ("parts per million"), bei den Exhalationsversuchen in Nanomol/ (kg Körpergewicht x Stunde) angegeben.

3.1. Kinetik bei den Expositionsversuchen

Nach Injektion gasförmiger Kohlenwasserstoffe in das Exsikkatorsystem zeigt die Kurve, die bei der Verfolgung der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase über die Zeit erhalten wird, folgende Charakteristika, wie am Beispiel der Exposition mit n-Pentan (Abb. 2.3.) erläutert werden soll: Trägt man den Logarithmus der Gaskonzentration gegen die Zeit auf (Kurve A), so erhält man einen initialen nichtlinearen Abfall (Segment I), der nach circa 20 Minuten in einen linearen Abfall (Segmente II) übergeht. Nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Hemmstoffen wie Dithiocarb oder Ethanol erhält man die Kurve B, die noch das nichtlineare initiale Segment I zeigt, während das Segment II eine deutliche, gegen Null tendierende Verringerung seiner Steigung aufweist. Zur Interpretation dieser Kurvenverläufe wurde von folgender Überlegung ausgegangen: Segment I spiegelt die Verteilung der Testsubstanz zwischen Gasraum und Versuchstieren wieder, Segment II die Biotransformation bzw. die metabolische Elimination des Kohlenwasserstoffes aus dem Gesamtsystem. Segement II entspricht einer Kinetik nullter Ordnung.
Zur Berechnung der kinetischen Größen wurde ein Zweikompartimentenmodell (Filser, 1979; Filser und Bolt 1979) verwendet (Abb. 2.4.).

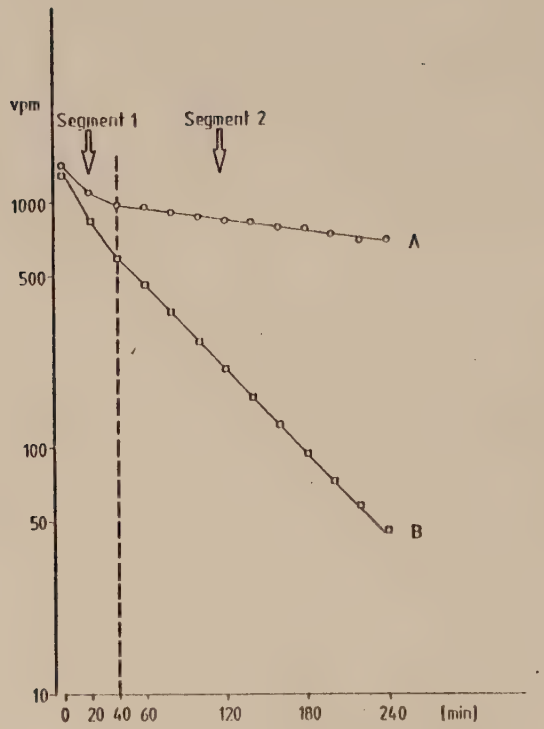


Abbildung 2.3.: Elimination von n-Pentan aus dem Gasraum eines statischen Expositionssystems durch zwei männliche Wistar Ratten.
Segment 1 in Kurve A entspricht der Verteilung der Substanz bei durch Ethanol (5g/kg) gehemmten Stoffwechsel, Segment 2 in Kurve A der Elimination durch den residualen Stoffwechsel. Segment 1 in Kurve B resultiert aus der Überlagerung von Verteilung und metabolischer Elimination, Segment 2 in Kurve B aus dem gehemmten Metabolismus.

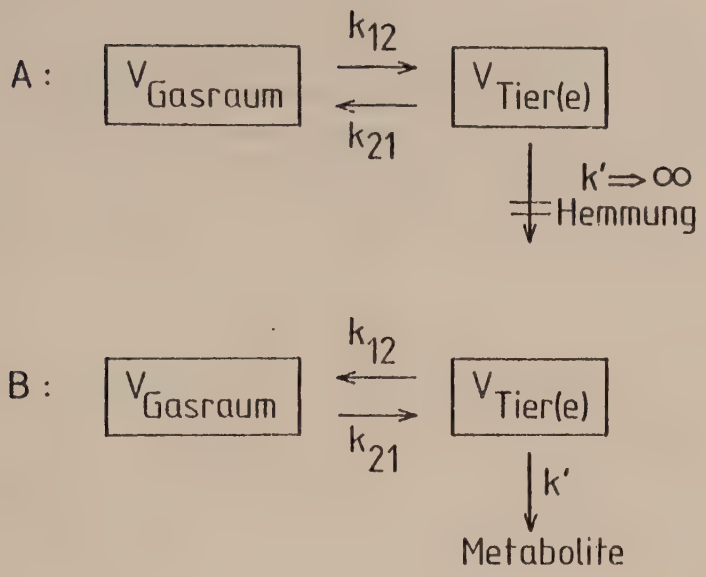


Abbildung 2.4.: Zweikompartimentenmodell für die Elimination flüchtiger Substanzen aus dem Gasraum eines statischen Expositionssystems durch Labortiere in vivo (nach Filser und Bolt, 1979).

3.1.1. Einstellung des Gleichgewichts

Beim gehemmten Stoffwechsel (Situation A) wird sich bei einmaliger Applikation einer Kohlenwasserstoffmenge N zu Beginn des Experiments (t=0) im Gasraum mit dem Volumen V_G eine Konzentration $C_{G(T=0)}$

1) $$C_{G(t=0)} = \frac{N}{V_G}$$

ausbilden. Diese Gesamtmenge wird sich dann nach

2) $$C_{G(t=0)} \cdot V_G = C_G \cdot V_G + C_T \cdot V_T = N$$

zwischen dem Volumen V_T der Versuchstiere und V_G verteilen. Nach Abschluß der Verteilung ($t=\infty$) beträgt die Konzentration C_T im Tier

3) $$C_T = (C_{G(t=0)} - C_G) \cdot \frac{V_G}{V_T}$$

Die Gleichgewichtskonstante K_{eq} ist definiert als

4) $$K_{eq} = \frac{C_T}{C_G}$$

Da C_T in diesem Experiment nicht direkt bestimmt werden kann, muß man Gleichung 3) in Gleichung 4) einsetzen und erhält

5) $$K_{eq} = \frac{(C_{G(t=0)} - C_G) \cdot V_G}{C_G \cdot V_T}$$

V_G und V_T (die Dichte der Tiere wird gleich 1 gesetzt) sind bekannt, und $C_{G(t=0)}$ sowie C_G lassen sich gaschromatographisch bestimmen bzw. C_G läßt sich durch Extrapolation des in der halblogarithmischen Darstellung linearen Segments II auf t=0 gewinnen.

3.1.2. Metabolismus

Aus der Analyse des Segments II der Meßkurve bei nicht gehemmtem Stoffwechsel (Situation B in Abb. 2.4.) lassen sich die kinetischen Daten für die metabolische Elimination der Testsubstanz aus dem Expositionssystem gewinnen. Das Segment II folgt einer Kinetik 1. Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstante k' (Dimension h^{-1}). es gilt hierbei

$$6) \qquad C_G = C_{Go} \cdot e^{-k't}$$

C_G ist hierbei die Konzentration des Stoffes im Gasraum zur Zeit t (gemessen in ppm), C_{Go} die fiktive Anfangskonzentration zur Zeit t=0 (ebenfalls in ppm).
Die Eliminationskonstante k' läßt sich entweder mit Hilfe eines Rechnerprogramms über die Anpassung einer e-Funktion an die experimentellen Daten berechnen oder nach manueller Bestimmung der Eliminationshalbwertszeit aus der Meßkurve über die aus Gleichung 6) gewonnene Beziehung

$$7) \qquad k' = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

gewinnen. In der Pharmakokinetik ist es üblich, einen Eliminationsprozeß dieser Art über die Clearance zu beschreiben. Clearance (ml/h) ist dabei definiert als

$$8) \qquad Cl = k' \cdot V$$

wobei V das Volumen des Systems darstellt, das sich im vorliegenden Falle aus dem Gasraum V_G und dem Tiervolumen V_T zusammensetzt. Da sich die Testsubstanz im Versuchstier anreichert, muß für V das sogenannte imaginäre Verteilungsvolumen angesetzt werden:

$$9) \qquad V_I = V_G + K_{eq} \cdot V_T$$

Die Clearance wird dann:

10) $$Cl = k' \cdot V_I$$

Bezieht man nun zur Erreichung leichterer Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten auf jeweils 1 Kilogramm Körpergewicht, erhält man

11) $$\frac{Cl \cdot 10^3}{G_T} = k' \cdot V_I \cdot \frac{10^3}{G_T}$$

wobei der Faktor 10^3 wegen der Umrechnung von Gramm auf Kilogramm bzw. von Milliliter auf Liter eingeführt wird. Die Clearance hat dann eine Dimension von Liter pro Kilogramm pro Stunde.

3.2. Kinetische Analyse der Exhalationsexperimente

Verfolgt man die Zunahme von Kohlenwasserstoffen, die von den Versuchstieren durch Exhalation aus endogenen Quellen in die kleinen Exsikkatorsysteme mit 800 Milliliter Volumen abgegeben werden, über die Zeit, so zeigen die aus den Meßergebnissen gewonnenen Konzentrations-Zeit-Kurven Sättigungscharakteristik.
Einen ähnlichen Kurvenverlauf erhält man bei der Verfolgung der Plasmakonzentration von Pharmaka bei Dauerinfusion mit konstanter Infusionsgeschwindigkeit. Hier beobachtet man nach einem initalen Anstieg ein Plateau, weil bei Erreichen einer bestimmten Konzentration der Anstieg der Pharmakakonzentration durch die Infusion durch die metabolische Elimination oder andere Eliminationsprozesse kompensiert wird. Diese Gleichgewichtsbedingungen werden nach Gladtke und v. Hattingenberg (1979) wie folgt beschrieben:

$$12) \qquad y'' = \frac{v}{V \cdot k_2}$$

y" ist die Plasmakonzentration im Gleichgewicht mit der Dimension Nanomole/Liter, die Einströmgeschwindigkeit v hat die Dimension Nanomole/Stunde, V ist das Verteilungsvolumen des beobachteten Systems in Litern und k_2 ist die Eliminationskonstante 1. Ordnung mit der Dimension pro Stunde.
Für die Anpassung dieser Formel an die Exhalationsexperimente wurde Gleichung 12) zunächst umgeformt:

$$13) \qquad v = y'' \cdot V \cdot k_2$$

Wegen der Anreicherung der Kohlenwasserstoffe im Tierkompartiment wurde das imaginäre Verteilungsvolumen aus Gleichung 9) eingeführt.

$$14) \qquad v = y'' \cdot V_i \cdot k_2$$

$y'' \cdot V_i$ ist die Gesamtmenge an Substanz (=Pool) im System. Da $k_2 = k'$, kann man in Gleichung 14) auch Gleichung 10) einsetzen:

15) $\quad v = y'' \cdot Cl$

Um die kinetischen Parameter, die bei den Expositionsversuchen in den großen Exsikkatorsystemen gewonnen wurden, zur Ermittlung der exhalierten Mengen im Gleichgewicht in den kleinen Systemen heranziehen zu können, muß folgende Überlegung folgen:
Im großen Exsikkator wurden je zwei Ratten exponiert, die die applizierten Gase mit einer Clearance Cl_1 eliminierten. Im kleinen Exsikkator wurde die Exhalation von nur je einer Ratte verfolgt. Durch diese Halbierung des metabolischen Systems wurde auch die Clearance halbiert:

16) $\quad \frac{Cl_1}{2} = Cl_2$

Cl_2 ist somit die Clearance, die für das kleine Exsikkatorsystem gilt. Da die Clearance vom imaginären Verteilungsvolumen und der Eliminationskonstante abhängt, kann man für Gleichung 16) auch schreiben, wenn man Gleichung 10) in 16) einsetzt:

17) $\quad \frac{Cl_1}{2} = Cl_2 = \frac{V_{i1} \cdot k'_1}{2} = V_{i2} \cdot k'_2$

V_{i1} und k'_1 sowie V_{i2} und k'_2 sind die imaginären Verteilungsvolumina sowie die Eliminationskonstanten im großen Expositions- und im kleinen Exhalationssystem.
Nach Umformung ergibt sich dann für k'_2:

18) $\quad k'_2 = \frac{1}{2} \cdot \frac{Cl_1}{V_{i2}}$

Die bei den Exhalationsversuchen gewonnenen Ergebnisse werden in der Regel in der Dimension Nanomole pro Kilogramm Körpergewicht angegeben.
Sie beziehen sich dabei nur auf die tatsächlich in den Gasraum abgegebene Menge N. Die Gesamtmenge im Gleichgewicht N" schließt aber das Versuchstier-Volumen mit ein und es ergibt sich:

19) $$N'' = y'' \cdot V_{i2} = y'' \cdot V_G + y'' \cdot K_{eq} \cdot V_T =$$

$$= y'' (V_G + K_{eq} \cdot V_T)$$

V_G ist das Volumen des Gasraums im kleinen Exsikkator, V_T das Volumen des Versuchstiers und K_{eq} die Gleichgewichtskonstante.

4. Ergebnisse

4.1. Versuche mit isolierten Parenchymzellen aus Rattenlebern

4.1.1. Auslösung der Lipidperoxidation

Zur Verfolgung der bei der Inkubation der isolierten Leberparenchymzellen auftretenden Lipidperoxidation wurde die colorimetrische Bestimmung von Thiobarbitursäure-positivem Material nach Reiner et al. (1972) verwendet. Diese Methode erfaßt in der Hauptsache Malondialdehyd, das als Produkt des Zerfalls peroxidierter Fettsäuren entsteht, und damit als indirekter Marker für Lipidperoxidation wirkt.

Inkubiert man Hepatozyten mit Bromtrichlormethan (BTM), einer leicht homolytisch spaltbaren Organohalogenverbindung, die in Mikrosomen (Slater und Sawyer, 1971) und isolierten Rattenleberzellen (Remmer et al., 1977; Köster-Ahlbrecht et al., 1978) Lipidperoxidation auslöst, so erhält man die in Abb. 6 gezeigte zeitabhängige und in Abb. 3.1. gezeigte dosisabhängige Zunahme der Konzentration an Thiobarbitursäure-positivem Material als Ausdruck der stattfindenden Lipidperoxidation.

Da die Dosis-Wirkungskurve in dem beobachteten Bereich Sättigungscharakteristik offenbart, wurde in den folgenden Versuchen nur noch eine Bromtrichlormethankonzentration von 1 mM verwendet, um Lösungsmitteleffekte dieser Substanz zu unterdrücken, die mit der durch Lipidperoxidation ausgelösten Zellschädigung interferieren könnten.

Als weiteres wurde versucht, Lipidperoxidation durch Ethanol auszulösen: Der Befund, daß Antioxidantien die durch Ethanol ausgelöste Steatosis der Leber mildern, führte Di Luzio und Hartman (1967) zu der These, daß Ethanol seine leberschädigende Wirkung über den Mechanismus der entweder von ihm selbst oder von seinen Metaboliten ausgelösten Lipidperoxidation ausüben könnte. Dies wurde in der Folgezeit zum Teil bestätigt (z.B. Comporti et al., 1967; Reitz, 1975),

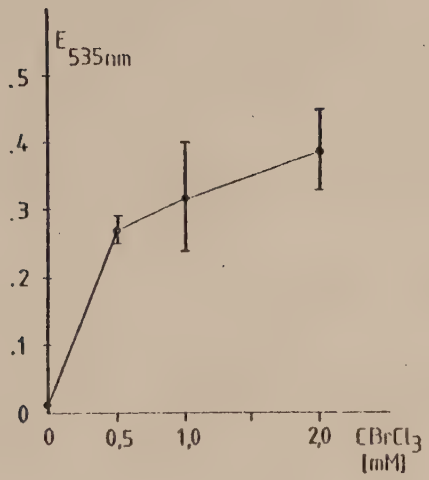


Abbildung 3.1.: Dosis-Wirkungskurve für die durch Bromtrichlormethan in isolierten Hepatozyten induzierte Produktion von Thiobarbitursäure-positivem Material (Malondialdehyd) während eines Inkubationszeitraums von 2 Stunden.

zum Teil angezweifelt (z.B. Bunyan et al., 1969; Hashimoto und Recknagel, 1968).
Die Inkubation von Hepatozyten mit Ethanolkonzentrationen von 2, 5, 10, 20, 40, 60 und 112 mM in der Inkubationslösung führte zu keiner Erhöhung der Malondialdehydkonzentration über die Kontrollwerte, die aus endogener Lipidperoxidation stammten (Abb. 3.2.).
Auch die Inkubation mit dem Stoffwechselprodukt Acetaldehyd in Konzentrationen von 0,2 und 1 mM führte zu keiner Erhöhung der endogenen und in der Regel sehr niedrigen Lipidperoxidation.
Ethanol beeinflußte aber die durch BTM ausgelöste Lipidperoxidation: Abb. 3.2. zeigt die Verstärkung der durch BTM ausgelösten Lipidperoxidation durch eine fünf Minuten lange Vorinkubation der Hepatozyten mit 100 mM Ethanol. Der Anstieg der Malondialdehydkonzentration ist nach dieser Vorinkubation steiler und die nach 120 Minuten beobachteten Werte liegen höher, während wie bereits oben beschrieben, keine Veränderung der endogenen Lipidperoxidation stattfand.

Eine weitere Möglichkeit der Steigerung der BTM-induzierten Lipidperoxidation durch Ethanol konnte durch die Applikation von Ethanol (5g/kg, per os) 12 Stunden vor der Zellgewinnung an die Leberspender gezeigt werden: Abb. 3.2. zeigt, daß nach dieser Vorbehandlung sowohl der Anstieg der Malondialdehydkonzentration nach Inkubation mit 0,5 und 1 mM BTM wie auch mit 1 mM BTM nach zusätzlicher Vorinkubation der Zellen mit 100 mM Ethanol deutlich über dem liegt, der mit Hepatozyten aus nichtvorbehandelten Ratten gewonnen wurde.
Auch der Endwert nach 2-stündiger Inkubation lag höher.
Die endogene Lipidperoxidation wird durch diese Vorbehandlung nicht betroffen. Auch hier zeigt die Inkubation mit 100 mM Ethanol allein keine Erhöhung der endogenen Malondialdehydproduktion.
Wie Abb. 3.2. zeigt, ist diese durch Ethanol hervorgerufene

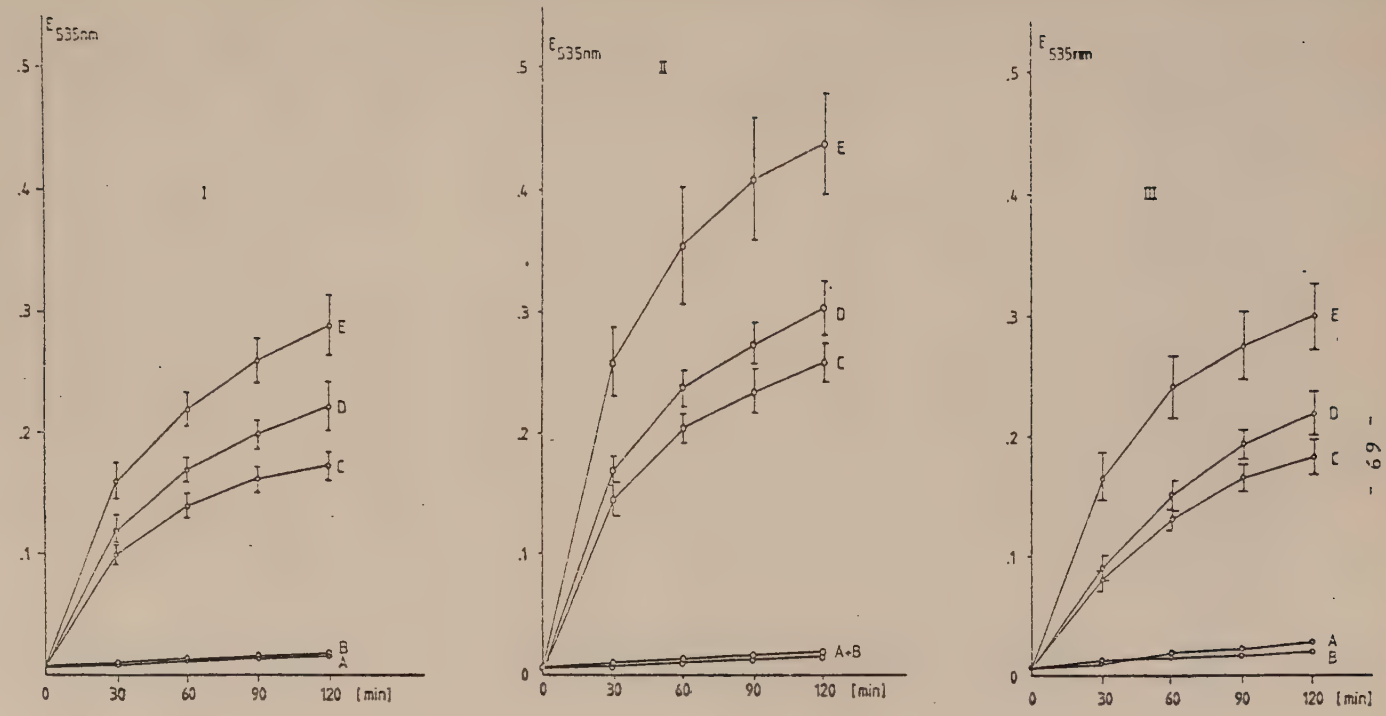


Abbildung 3.2.: Zeitlicher Verlauf der Zunahme an Thiobarbitursäure-positivem Material (Malondialdehyd) während der Inkubation von isolierten Hepatozyten männlicher Wistar Ratten, die nicht vorbehandelt (I, n=5) oder einmalig (5g/kg p.o.) 12 h (II, n=6) und 36 h (III, n=4) vor der Zellgewinnung Ethanol erhielten. A: Inkubation ohne Zusätze, B: 100 mM Ethanol im Ansatz, C: 0,5 mM und D: 1 mM Bromtrichlormethan im Ansatz, E: Vorinkubation mit 100 mM Ethanol für 5 Minuten mit nachfolgender Applikation von 1 mM Bromtrichlormethan. Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

Stimulation der durch BTM erzeugten Lipidperoxidation 36 Stunden nach der Ethanolgabe nicht mehr nachzuweisen. Sowohl der Anstieg der Malondialdehydkonzentration wie auch die nach 120-minütiger Inkubation der Hepatozyten mit 0,5 und 1 mM BTM sowie 1 mM mit 5-minütiger Vorinkubation mit 100 mM Ethanol erzielten Endwerte entsprechen dem, was mit unbehandelten Tieren beobachtet wurde.

Die bisher geschilderten Ergebnisse wurden mit Hepatozyten aus männlichen Ratten erzielt.

Wurden weibliche Tiere als Zellspender benutzt, so zeigten die Ergebnisse ein weitgehend identisches Bild, wenn die Tiere unbehandelt waren:

Die Inkubation von Hepatozyten aus unbehandelten weiblichen Ratten (Abb. 3.3., Kontrolle) mit 0,5 und 1 mM BTM ergab im Vergleich zu Zellen ebenfalls unbehandelter männlicher Tiere geringfügig, aber nicht signifikant erniedrigte Malondialdehydwerte. Vorinkubation der Leberzellen mit 100 mM Ethanol für fünf Minuten vor dem Zusatz von BTM verstärkte die Malondialdehydbildung, wobei auch hier gegenüber Zellen aus männlichen Spendern geringfügig, aber nicht signifikant erniedrigte Werte beobachtet wurden.

Wie bereits mehrfach geschildert, führte auch hier die Inkubation der Hepatozyten allein mit 100 mM Ethanol zu keiner höheren Malondialdehydkonzentration als bei der Inkubation ohne Zusätze.

Verwendete man Leberzellen aus weiblichen Ratten, die 12 Stunden vor der Zellgewinnung mit Ethanol (5g/kg per os) behandelt worden waren, so zeigte sich gegenüber den entsprechenden Versuchen mit Hepatozyten männlicher Ratten eine gewisse Sexualspezifität: hatte 0,5 mM BTM bei der Inkubation mit Zellen aus männlichen Ratten zu einer signifikant stärkeren Lipidperoxidation geführt, wenn die Tiere 12 Stunden vorher mit Ethanol behandelt worden waren, so zeigte sich dieser Effekt nicht, wenn die Hepatozyten aus weiblichen Tieren stammten (Abb. 3.3., Ethanolvorbehandlung, Kurve C). 1 mM BTM induzierte eine stärkere Lipidperoxidation als bei Zellen aus unbehandelten Tie-

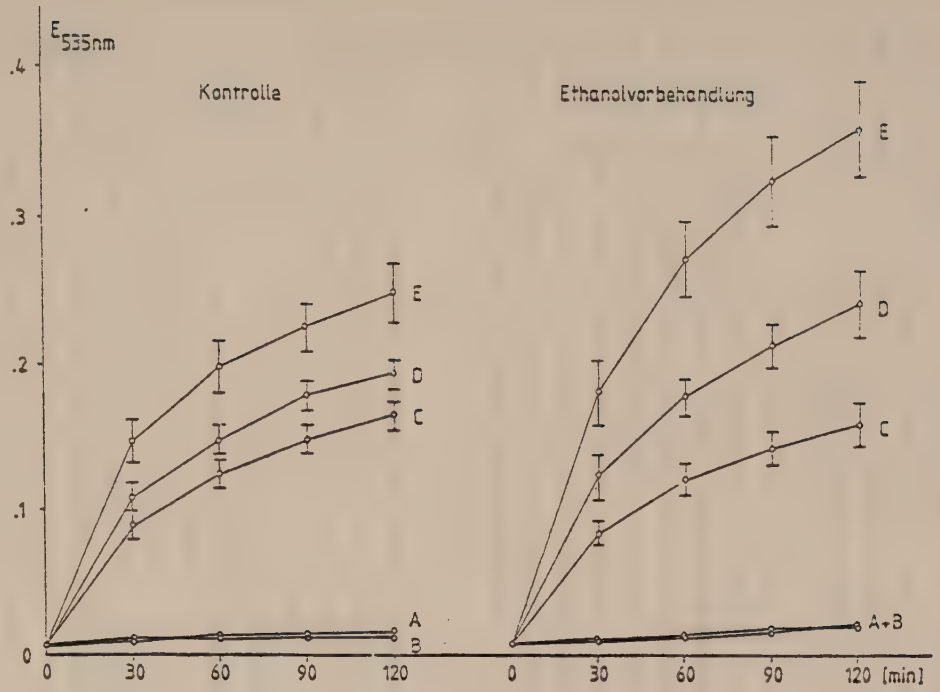


Abbildung 3.3.: Zeitlicher Verlauf der Malondialdehydbildung bei der Inkubation von Hepatozyten aus weiblichen Wistar Ratten. Die Kontrollkurven wurden mit Zellen aus unbehandelten Tieren erhalten. Die Ethanolvorbehandlung wurde durch einmalige orale Gabe von 5g/kg, 12 h vor der Zellisolierung, erzielt.
A: endogene Lipidperoxidation, B: Inkubation von 100 mM Ethanol, C: 0,5 mM Bromtrichlormethan, D: 100 mM Bromtrichlormethan, E: Vorinkubation mit 100 mM Ethanol und anschließender Zusatz von 1 mM Bromtrichlormethan.

ren (Kurve D), die nach zwei Stunden sehr deutlich war. Erst die Vorinkubation der Hepatozyten mit 100 mM Ethanol zeigte eine mit 1 mM BTM ausgelöste Malondialdehydbildung, die von Anfang des Experiments an über der lag, die mit Zellen unbehandelter weiblicher Tiere beobachtet worden war (Kurven E).
Die Inkubation mit 100 mM Ethanol verstärkte nicht die endogene Lipidperoxidation von mit Ethanol vorbehandelten weiblichen Tieren (Abb. 3.3., Kurven A und B).

Ethanol wird mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1.) in Hepatozyten zu Acetaldehyd metabolisiert (Grunnert et al., 1973; Mørland et al., 1980 und Vina et al., 1980). Da dieser reaktive Metabolit für eine Reihe von cytotoxischen Effekten wie Glutathionverarmung (Takeuchi et al., 1969), Abfall des Coenzym-A-Spiegels (Ammon et al., 1969) und Schwesterchromosomenaustausch (Obe und Ristow, 1977) verantowrtlich gemacht wird, wurde geprüft, ob Acetaldehyd einen Einfluß auf die Lipidperoxidation in Hepatozyten ausübt.
Der direkte Zusatz von Acetaldehyd in Konzentrationen von 0,1; 0,2; 0,5 und 1 mM zum Inkubationsansatz führt zu keiner stärkeren Malondialdehydfreisetzung als bei Kontrollansätzen ohne Acetaldehyd (Tabelle 4.1.).
Präinkubation der Hepatozyten mit 0,2 und 1 mM Acetaldehyd mit nachfolgender Auslösung der Lipidperoxidation durch 1 mM BTM führte zu wechselnden Ergebnissen: Acetaldehyd hemmte zum Teil in diesen Versuchen die BTM-induzierte Malondialdehydbildung um 10 bis 50 Prozent, wobei aber keine Dosisabhängigkeit beobachtet werden konnte. In einem Teil der Versuche trat jedoch ein umgekehrter Effekt auf: Die Malondialdehydwerte, die durch BTM induziert wurden, lagen zwischen 10 und 20 Prozent höher, wenn die Hepatozyten mit Acetaldehyd vorinkubiert worden waren. Auch dieser stimulierende Effekt wies keine Abhängigkeit von der applizierten Acetaldehyd-Dosis auf.

In einigen Versuchen wurde zur Auslösung der Lipidperoxidation Tetrachlorkohlenstoff zum Inkubationsansatz zugefügt. Diese Substanz wird wie BTM mit Hilfe der mikrosomalen Elektronentransportkette (Cytochrom-c-Reduktase und Cytochrom P-450) zum CCl_3-Radikal dehalogeniert. Diesem Metaboliten wird die hepatotoxische Wirksamkeit zugeschrieben (Slater, 1972). Recknagel et al. (1966a) beobachteten in vivo das Ansteigen konjugierter Diene nach Tetrachlorkohlenstoffgabe als Ausdruck der durch diese Substanz oder ihre Metabolite ausgelösten Lipidperoxidation und schrieben diesem Mechanismus die hauptsächliche Verantwortung für die leberschädigende Wirkung des Organohalogens zu.
In den unter Raumluft inkubierten Hepatozytenansätzen konnte mit 8 mM Tetrachlorkohlenstoff überraschenderweise aber nur eine geringe Lipidperoxidation ausgelöst werden, die nur 2,5-mal höher lag als die, die in Ansätzen ohne Zusätze endogen erreicht wurde. BTM (1 mM) führte dagegen in Parallelansätzen zu einer 20-fachen Erhöhung der Malondialdehydkonzentration nach 120-minütiger Inkubation (Tabelle 4.1.).

Tabelle 4.1.: Malondialdehydentwicklung in Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten (Werte eines Experiments).

Zusatz	$E_{535\ nm}$ nach 120 Minuten Inkubation
-	0,015
Acetaldehyd 0,2 mM	0,017
Acetaldehyd 1,0 mM	0,013
CCl_4 0,8 mM	0,0425
Bromtrichlormethan 1,0 mM	0,340

4.1.2. Einflüsse der chronischen Vorbehandlung mit Ethanol auf die Lipidperoxidation in Hepatozyten

Verschiedene Autoren (Comporti et al., 1973 und Reitz, 1975) haben nachgewiesen, daß die Behandlung von Leberhomogenaten mit Ethanol besonders dann zu einer vermehrten Malondialdehydbildung führt, wenn die Versuchstiere vor der Lebergewinnung chronisch mit Ethanol behandelt worden waren. Maling et al., (1975) zeigten eine Verstärkung der Hepatotoxizität von Tetrachlorkohlenstoff nach Vorbehandlung mit Ethanol. Remmer et al. (1977) beschrieben, daß die endogene Lipidperoxidation von Hepatozyten erhöht war, wenn die Spendertiere chronisch mit Ethanol-Glucose-Lösung als Trinkflüssigkeit behandelt worden waren. Auch lag die in Hepatozyten durch BTM auslösbare Lipidperoxidation über der, die in Zellen von Tieren erzeugt werden konnte, die Trinkwasser erhielten.
In den vorliegenden Versuchen erhielten die Tiere die folgenden Diäten:

1. Trinkwasser und pelletierte Standarddiät Altromin C 1320 als Kontrollgruppe,
2. Saccharose (46,9% w/v) in Wasser und Altromin C 1320 als isokalorisch versorgte Vergleichsgruppe zu den Ethanolgruppen,
3. Ethanol (16% w/v) und Glucose (20% w/v) in Wasser und Altromin C 1320 und
4. Ethanol (16% w/v) und Saccharose (20% w/v) in Wasser und Altromin C 1320.

Nach Porta et al. (1968) erhöht der Zusatz von Glucose bei Ratten die Akzeptanz derEthanollösung. Zur Verringerung der Osmolarität der Trinkflüssigkeit wurde jedoch in einer Tiergruppe Saccharose als süßendes Agens verwendet, desgleichen in der isokalorischen Vergleichsgruppe.
Im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe um Hartroft (Porta et al., 2968; Gomez-Dumm et al., 1968 und Koch et al., 1968), die bei chronischer Ethanolexposition Trinkflüssigkeiten mit 25% Saccharose und 32% Ethanol (w/v) verwendet hatten, was

zu Wachstumsstillstand bei den Versuchstieren geführt hatte, wurden in den vorliegenden Untersuchungen nur 20%ige Ethanollösungen verwendet, die bis auf eine 10-tägige Adaptionsphase (Remmer et al., 1977), in der das Tierwachstum auf Grund verringerter Flüssigkeitsaufnahme und daraus resultierender verringerter Festfutteraufnahme stagnierte (Abb. 3.5.), nicht zu einer Wachstumsstörung führte. Unter diesen Bedingungen sind aber bereits Einflüsse auf die Enzyme des endoplasmatischen Retikulums sowie ein Anstieg der Leberlipide beschrieben worden (Aryoshi et al., 1970).
In diesen chronischen Versuchen konsumierten die Ratten aus den Ethanolgruppen wie auch aus der isokalorischen Vergleichsgruppe die gleiche Kalorienmenge pro Kilogramm Körpergewicht wie die Kontrollgruppe, die Festfutter und Trinkwasser erhielt, nämlich 230 kcal pro kg und Tag. Bei den Alkoholgruppen setzte sich die Kalorienzufuhr wie folgt zusammen: 47% stammte aus dem Festfutter, 23% stammte aus dem Zucker in der Trinkflüssigkeit und 30% stammte aus dem Ethanol, was einer täglichen Ethanolaufnahme von 8,5g pro Kilogramm Körpergewicht entspricht. Bei den isokalorisch ernährten Vergleichstieren wurde der Energiebedarf zu 52% aus dem Festfutter und zu 48% aus der Saccharoselösung gedeckt (Tabelle 4.2.).
Den Einfluß dieser unterschiedlichen Vorbehandlungen auf die in den aus diesen Tieren isolierten Leberparenchymzellen entweder endogen ablaufende oder durch Ethanol (112 mM), BTM (1 mM) oder durch die gemeinsame Applikation von BTM und Ethanol (1 mM und 112 mM) provozierte Lipidperoxidation zeigt Abb. 3.5.: Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen wurde die Inkubationszeit auf drei Stunden verlängert, Probenahmen begannen erst 15 Minuten nach Beginn der Inkubation und Ethanol wurde zusammen mit Bromtrichlormethan appliziert. Auf eine Präinkubation mit Ethanol allein wurde verzichtet.
Während der dreistündigen Inkubation zeigte sich, daß Ethanolvorbehandlung der Versuchstiere keine Erhöhung der endogenen Malondialdehydproduktion bewirkte. Die erhaltenen

Werte lagen im Bereich derer, die mit Hepatozyten von naiven, also in ihrer Diät nicht belasteten Kontrolltieren erhalten wurden oder sogar geringfügig niedriger.

Tabelle 4.2.: Energieversorgung von männlichen Wistar Ratten bei unterschiedlichen Diäten (Prozent der Kalorien aus den Bestandteilen der Nahrung)

Diätbestandteil	Saccharosediät (46,9% w/v im Trinkwasser)	Ethanoldiät (16% Ethanol w/v und 20% w/v im Trinkwasser)
Ethanol	0	30
Kohlehydrate	81	53
Protein	12,5	11,5
Fett	6	5,5

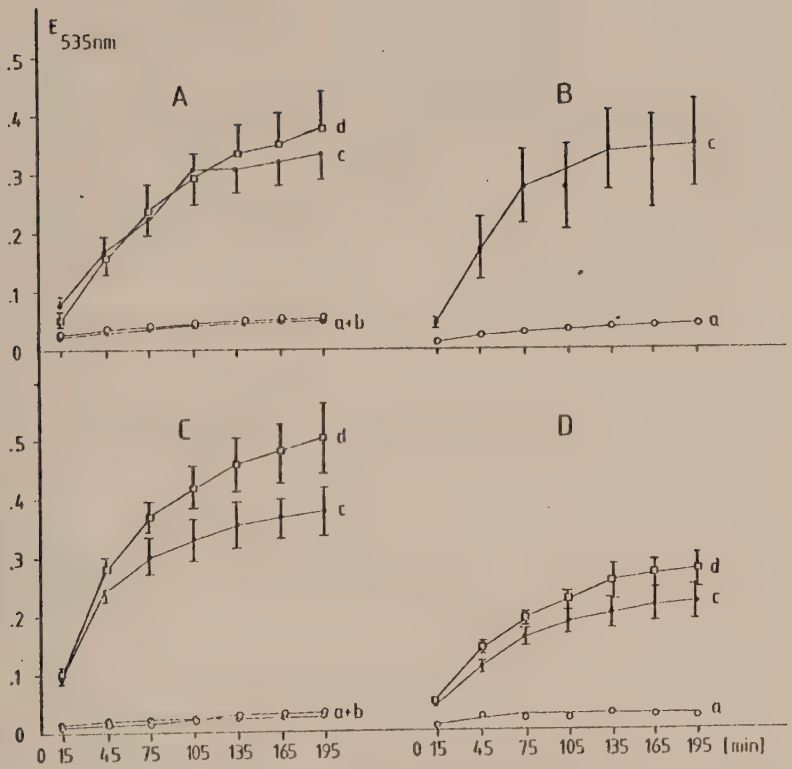


Abbildung 3.5.: Zeitverlauf der Malondialdehydbildung bei Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten ohne Vorbehandlung (A, n=7) und nach chronischer Applikation von Saccharoselösung (B, n=4), Ethanol/Glucose-Lösung (C, n=7) und Ethanol/Saccharoselösung (D, n=4) als alleiniger Trinkflüssigkeit. a: endogene Lipidperoxidation, b: Inkubation mit 112 mM Ethanol, c: 1 mM Bromtrichlormethan, d: gleichzeitiger Zusatz von 112 mM Ethanol und 1 mM Bromtrichlormethan zum Inkubationsmedium.
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

Die Inkubation mit 112 mM Ethanol entspricht einer Konzentration wie sie nach einer in vivo Gabe von 5g pro Kilogramm Körpergewicht auftreten kann. Bei einer solchen Behandlung kommt es zu einer massiven Triglyceridakkumulation in der Leber (Mallov und Bloch, 1956, Di Luzio, 1964; Hartroft et al., 1964), für deren Genese Lipidperoxidation verantwortlich gemacht wird (Di Luzio und Hartman, 1967). Inkubiert man Hepatozyten von chronisch mit Ethanol-Zuckerlösung versorgten Tieren mit einer solchen Ethanolkonzentration, so erhält man keine höheren Malondialdehydproduktionen als die bereits endogen erzeugten. Dieselbe Beobachtung wurde bei den nicht mit Ethanol behandelten Kontrolltieren gemacht.

Der Zusätz von Bromtrichlormethan (BTM, 1 mM) zu den Leberzellen führte, wie bereits oben beschrieben, bei allen Tiergruppen zu einem massiven Anstieg der Malondialdehydkonzentration. Ein besonders steiler Anstieg während der ersten 60 Minuten war bei Zellen von den Tieren zu beobachten, die Ethanol/Glucose-Lösung getrunken hatten (Abb. 3.5.). Hier wurde auch der höchste Endwert zum Ende der Inkubation erzielt. Die Malondialdehydentwicklung bei Kontroll- und Saccharose-Tieren war identisch und die Endwerte erreichten identische Plateaus.
Merkwürdigerweise war BTM bei Zellen aus Ethanol/Saccharose-Lösung trinkenden Ratten viel weniger wirksam. Nach einem geringeren Anstieg erreichte die Malondialdehydkonzentration einen signifikant niedrigeren Endpunkt.
Hier wurden nur 65 Prozent des Wertes beobachtet, der mit Zellen aus unbehandelten Kontrolltieren und nur 58 Prozent des Wertes, der mit Zellen aus Ethanol/Glucose-Tieren erreicht wurde.
Remmer et al. (1977) und Köster-Ahlbrecht et al. (1978) beschrieben die Auslösung der Lipidperoxidation in Hepatozyten durch Inkubation mit BTM, das in Ethanol als Lösungsmittel appliziert worden war. Bei dieser Methode wurde im Inkubationsansatz eine Ethanolkonzentration von 112 mM

erreicht. Wurde bei der Wiederholung dieser Versuche die Lipidperoxidation in Leberparenchymzellen ebenfalls durch die gleichzeitige Gabe von 1 mM BTM und 112 mM Ethanol ausgelöst (Abb. 3.5.), so konnten zum Ende der Inkubationsperiode bei den Ansätzen mit Zellen aus unbehandelten Kontrolltieren Malondialdehydkonzentrationen gemessen werden, die leicht, aber nicht signifikant erhöht über denjenigen lagen, die durch BTM allein bewirkt worden waren. Wurden aber Zellen von chronisch mit Ethanol vorbehandelten Tieren verwendet, so führte diese gemeinsame Anwendung von BTM und Ethanol zu einem steileren Anstieg und zum Ende der Inkubationsperiode zu einer signifikant höheren Konzentration an Malondialdehyd als bei der Applikation mit BTM allein erreicht worden war (Abb. 3.5., A, C, Kurven d).

4.1.3. Lipidperoxidation in Hepatozyten aus Ratten mit Vitamin-E-Mangel bei gleichzeitiger chronischer Ethanolvorbehandlung

Das bei Ratten Sterilität verhindernde Vitamin E übt neben enzymatischen Abwehrsystemen gegen freie Radikale in biologischem Material einen spezifischen Schutz der mikrosomalen und mitochondrialen Membranen durch seine Abfangreaktion mit während der Lipidperoxidation entstehenden Fettsäureperoxiradikalen aus (Witting, 1980). Daß dieser Mechanismus auch in vivo von Bedeutung ist, ergaben Versuche der Arbeitsgruppe um Tappel (Dillard et al., 1978; Downey et al., 1978), die zeigten, daß Ratten mit einem Vitamin-E-Mangel vermehrt Pentan abatmeten. Der Befund wurde als Ausdruck einer vermehrten peroxidativen Zerstörung von ungesättigten Fettsäuren in vivo bei Verlust dieses Schutzfaktors gedeutet. Weiterhin zeigte diese Gruppe eine darüber hinausgehende Vermehrung der Pentanproduktion, wenn diese Mangeltiere zusätzlich mit Ozon oder Ethanol behandelt worden waren (Litov et al., 1978), während die

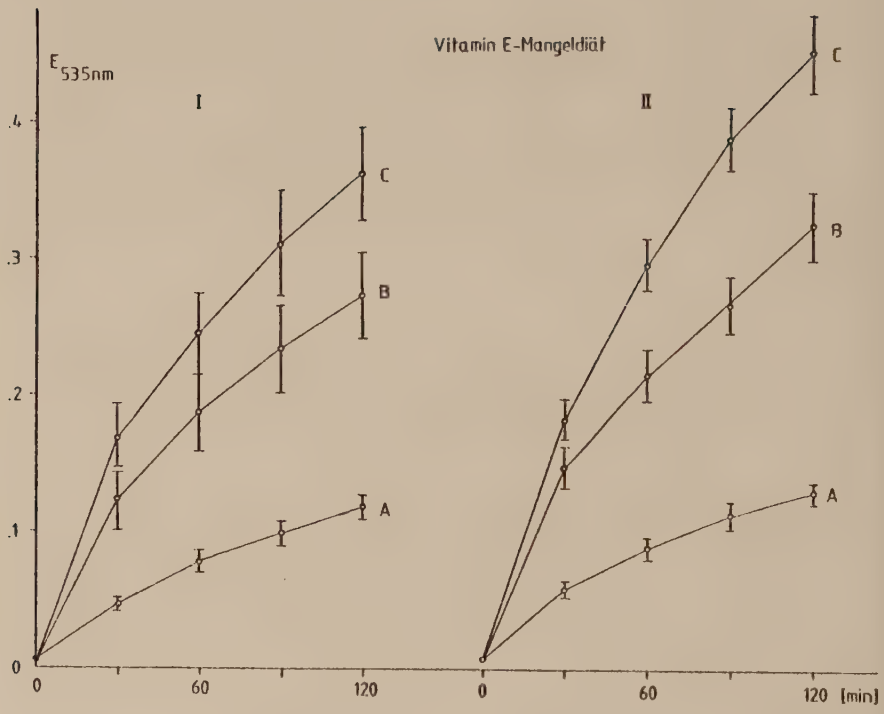


Abbildung 3.6.: Lipidperoxidation in Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten, die zusätzlich zu einer Vitamin E-armen Diät chronisch mit einer Ethanollösung (II) oder einer isokalorischen Saccharoselösung (I) als Trinkflüssigkeit versorgt worden sind. A: endogene Lipidperoxidation, B: 1 mM Bromtrichlormethan, C: Vorinkubation mit 100 mM Ethanol für 5 Minuten mit nachfolgender Zugabe von 1 mM Bromtrichlormethan.
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n=5)

Pentanabatmung von Kontrolltieren, die eine optimale Vitamin-E-Versorgung erhalten hatten, durch diese Agentien nicht beeinflußt werden konnte.

Zur Untersuchung des Einflusses einer Verarmung an Vitamin E auf die Lipidperoxidation in isolierten Leberparenchymzellen wurden männliche Wistar-Ratten 12 bis 14 Wochen lang mit der Altromindiät C 1018 ernährt, deren Vitaminzusatz kein Vitamin E enthielt. Als Trinkflüssigkeit erhielt eine Tiergruppe eine 26,9%ige Saccharoselösung, eine zweite eine 20%ige Ethanollösung, die mit 0,25% Saccharin versetzt worden war, um die Akzeptanz zu erhöhen.
Wie schon bei den vorhergehenden Versuchen mit chronischer Ethanolexposition beschrieben, führte die Ethanolgabe zu einem Wachstumsstillstand von 10 Tagen. Danach verlief die Gewichtszunahme der Tiere parallel zu der der Saccharose trinkenden Tiergruppe.

Durch diese Ernährungsweise deckten die Ethanol trinkenden Tiere 26 bis 30 Prozent ihres Energiebedarfs aus der Trinkflüssigkeit. Sie nahmen dabei täglich 10 bis 12 Gramm Ethanol pro Kilogramm Körpergewicht auf. Die Kontrollen deckten 40 bis 50 Prozent des Energiebedarfs aus der Saccharoselösung, die auf das Volumen bezogen, den gleichen Energiegehalt wie die Ethanollösung enthielt.

Die Verfolgung der Malondialdehydkonzentration während der Inkubation von Leberzellen, die aus diesen Vitamin-E-Mangeltieren gewonnen worden waren, ergab folgendes (Abb. 3.6.): Im Gegensatz zu den Versuchen mit Hepatozyten, die aus Tieren mit optimaler Vitamin-E-Versorgung stammten, wiesen die Zellen, die aus den Mangeltieren isoliert worden waren, eine massive endogene Malondialdehydproduktion auf. Sie entsprach der durch BTM ausgelösten in Hepatozyten aus normalernährten Ratten (Abb. 3.2. und Abb. 3.6., Kurve A). Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten, die mit Zellen aus Ethanol- oder Saccharoselö-

sung trinkenden Ratten erzielt wurden.

Wie auch in den früheren Experimenten regelmäßig beobachtet, führte auch hier die Inkubation der Hepatozyten mit 100 mM Ethanol zu keiner weiteren Erhöhung der Malondialdehydkonzentration über die, die aus endogenen Prozessen stammte. Diese Ergebnisse sind wegen besserer Übersichtlichkeit in Abb. 3.6. nicht dargestellt.

Wurden Zellen aus Saccharoselösung trinkenden E-Mangelratteń zusätzlich mit BTM (1 mM) behandelt (Abb. 3.2., Kurve C und 3.6., Kurve B), so war das Ausmaß der daraus resultierenden Lipidperoxidation nicht stärker als bei Zellen aus normal ernährten Tieren. Die Präinkubation der Zellen mit 100 mM Ethanol vor der BTM-Gabe (1 mM) führte erst nach zweistündiger Inkubation zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung des Malondialdehydwertes gegenüber Hepatozyten aus normalen Tieren.

Eine verstärkte Lipidperoxidation durch 1 mM BTM wurde jedoch bei Leberzellen aus E-Mangeltieren ausgelöst, die zusätzlich Ethanol tranken (Abb. 3.6., II). Hier wurden Malondialdehydkonzentrationen erreicht, die im Bereich derjenigen lagen, die in Zellen produziert worden waren, die von Tieren stammten, die 42 Stunden vor der Lebergewinnung akut eine Ethanoldosis von 5g/kg erhalten hatten (Abb. 3.2., II und 3.6., II).
Wurden die Hepatozyten vor der BTM-Applikation 5 Minuten lang mit 100 mM Ethanol vorinkubiert, so führte dies zu einer weiteren Steigerung der Malondialdehydbildung. Auch hier wurden Werte erzielt, die denen glichen, die aus Versuchen mit Zellen aus akut mit Ethanol belasteten Tieren gewonnen worden sind.

Um die Fähigkeit von BTM bzw. von BTM nach Ethanolpräinkubation zur Auslösung von Lipidperoxidation in Hepatozyten aus E-Mangelratten von der Vitaminmangel-bedingten

Lipidperoxidation unterscheiden zu können, wurden die Ergebnisse der soeben geschilderten Versuche noch in einer weiteren Form aufgetragen: In Abb. 3.7. sind die Malondialdehydkonzentrationen, die nach Gabe von BTM bzw. nach Präinkubation der Zellen mit 100 mM Ethanol und nachfolgender BTM-Applikation erhalten worden waren, abzüglich der Werte dargestellt, die durch die erhebliche endogene Lipidperoxidation hervorgerufen worden waren. BTM allein kann bei Zellen aus Saccharoseratten nur noch 62 Prozent der Malondialdehydmenge hervorrufen, die in Zellen aus normalernährten Tieren erzielt wurde. Die Präinkubation mit Ethanol erhöht zwar die BTM-bedingte Malondialdehydmenge zusätzlich, aber die erreichte Konzentration entsprach lediglich der, die in Zellen aus normal ernährten Tieren mit 1 mM BTM allein erreicht wurde (Abb. 3.2., I und 3.7.).

Vergleicht man dagegen die durch BTM ausgelöste Lipidperoxidation in Hepatozyten aus E-Mangelratten, die zusätzlich chronisch Ethanol getrunken hatten, mit der in Hepatozyten aus normal ernährten Tieren (Abb. 3.2., I und 3.7., II), so sieht man, daß BTM hier das gleiche Potential zur Auslösung von Lipidperoxidation besaß. Auch die Präinkubation mit Ethanol führte zu einer vergleichbaren Steigerung der Malondialdehydproduktion. Das bei dieser Auftragsweise erhaltene Bild (Abb. 3.7.) entspricht also im wesentlichen dem in Abb. 3.2. gezeigten Verhalten von BTM gegenüber Normalzellen: Nach einem geringfügig schwächeren Anstieg der Malondialdehydkonzentration erreichen die Werte zum Ende der Inkubationszeit sowohl mit BTM allein als auch nach Vorinkubation mit Ethanol nahezu identische Endpunkte.

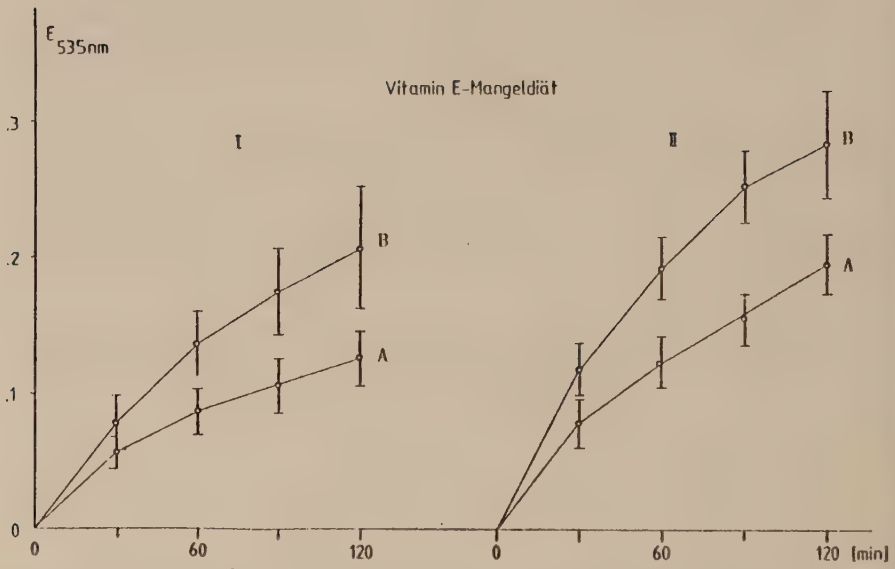


Abbildung 3.7.: Entwicklung von Thiobarbitursäure-positivem Material bei der Inkubation von Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten, die zusätzlich zu einer Vitamin E-armen Diät eine Ethanollösung (II) oder eine isokalorische Saccharoselösung (I) als Getränk erhalten haben. Werte nach Abzug der endogenen Malondialdehydproduktion. A: Inkubation mit 1 mM Bromtrichlormethan, B: Vorinkubation für 5 Minuten mit 100 mM Ethanol und anschließende Zugabe von 1 mM Bromtrichlormethan. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n=5)

4.1.4. Untersuchungen zur Vitalität der Hepatozyten

Zur Beurteilung der Qualität der in den bisher beschriebenen Experimenten verwendeten Hepatozyten wurde ein Teil der Kriterien untersucht, die von der Arbeitsgruppe Pfaff (Baur et al., 1975) erarbeitet worden sind.

4.1.4.1. Ausschluß von Trypanblau

Der anionische Farbstoff Trypanblau kann die Cytoplasmamembran intakter Zellen nicht passieren. Erst wenn die Oberflächenladung durch intrazellulären Energiemangel absinkt, kommt es zum Eindringen. Betrachtet man Zellen, deren Energieversorgung durch eine Schädigung gestört ist, unter dem Mikroskop, so findet sich der Farbstoff im Zellinneren und dort besonders im Cytoplasma.
Es wurden nur solche Hepatozytenpräparationen verwendet, die im Anschluß an die Isolierungsprozedur maximal 10 Prozent an mit Trypanblau anfärbbaren Zellen enthielten. In der Regel enthielten die Zellsuspensionen 5 bis 8 Prozent an anfärbbaren Zellen. Die geringste beobachtete Anfärberate lag bei 3,5 Prozent.

4.1.4.2. Austritt von Lactatdehydrogenase

Nach Baur et al. (1975) stellt die Bestimmung des Austritts der Lactatdehydrogenase aus den isolierten Hepatozyten ein weiteres Maß für die Integrität der verwendeten Zellen dar. Dieses Enzym wird auch in vivo zru Beurteilung des Ausmaßes einer Leberzellschädigung zum Beispiel durch Tetrachlorkohlenstoff und Pilzgifte, aber auch bei akuter Hepatitis (Meyer-Bertenrath, 1976; Thomas, 1978) herangezogen. Um zu überprüfen, inwieweit die Inkubation der Hepatozyten allein oder mit Zusatz von BTM bzw. BTM zusammen mit Etha-

nol neben der Lipidperoxidation einen Einfluß auf die Vitalität der Hepatozyten ausübt, wurde wie bei Remmer et al. (1977), Lindström et al. (1978) und Köster-Ahlbrecht et al. (1978) der Austritt der Lactatdehydrogenase in das Inkubationsmedium während der Dauer der Inkubation verfolgt. Diese Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die entweder von unbehandelten, Saccharoselösung oder Ethanol/Glucose- bzw. Ethanol/Saccharose-Lösung trinkenden männlichen Wistar-Ratten gewonnen worden waren.

Wie Abb. 3.8. zeigt, wird der Austritt der Lactatdehydrogenase durch die Inkubation der Hepatozyten ohne Zusätze während der drei Stunden langen Inkubation nur geringfügig beeinflußt. Die Applikation von Ethanol dagegen führt zu einem signifikanten Anstieg des Austritts an Enzym aus den Zellen aus unbehandelten Tieren. BTM-Zusatz führte zu einer weiteren Vermehrung an Lactatdehydrogenaseaktivität im Inkubationsmedium, während die gemeinsame Applikation von BTM mit 112 mM Ethanol die Zellen nicht darüber hinausgehend schädigte.

Ein ähnliches Muster erhielt man bei der Verfolgung des Austritts der Lactatdehydrogenase aus Zellen, die von Saccharose trinkenden Tieren stammten. Der mechanische Streß durch die Agitation während der Inkubation erhöhte den Austritt an Aktivität nur geringfügig, während der Zusatz von BTM zu einem massiven Anstieg führte. Diese BTM-Wirkung wurde durch gleichzeitige Ethanolbehandlung nicht verstärkt (Abb.3.8.).

Bei der Inkubation von Zellen aus Tieren, die chronisch mit einer Ethanol/Glucose-Lösung versorgt worden waren, konnte mit BTM eine stärkere Lactatdehydrogenase-Freisetzung hervorgerufen werden als bei Zellen aus unbehandelten oder Saccharose trinkenden Tieren. Der Unterschied ist aber nicht signifikant. Die Inkubation mit BTM und Ethanol gemeinsam führte dagegen zu einer signifikant höheren Lac-

tatdehydrogenaseabgabe ins Medium sowohl im Vergleich zur Wirkung von BTM allein als auch im Vergleich zur gemeinsamen Wirkung von BTM und Ethanol auf Zellen aus Kontroll- und Saccharosetieren (Abb. 3.8.). Die geringfügige Erhöhung der Enzymabgabe durch Ethanol, die während der Inkubation auftrat, war dagegen nicht signifikant.

Auch bei Hepatozyten, die von Tieren stammten, die chronisch eine Ethanol/Saccharose-Lösung als Trinkflüssigkeit konsumiert hatten, führte die Inkubation ohne Zusatz zu keinem wesentlichen Austritt an Lactatdehydrogenase (Abb. 3.8.). Wie schon für die Lipidperoxidation beschrieben, konnte bei diesen Zellen nur eine geringere Zellschädigung durch BTM als bei Zellen aus Ethanol/Glucose-Trinkern festgestellt werden. Allerdings war der verminderte Enzymaustritt nicht statistisch signifikant (p war größer als 0,05). Bei diesen Zellen war auch die verstärkende Wirkung von Ethanol auf die BTM-bedingte Zellschädigung statistisch nicht abzusichern.

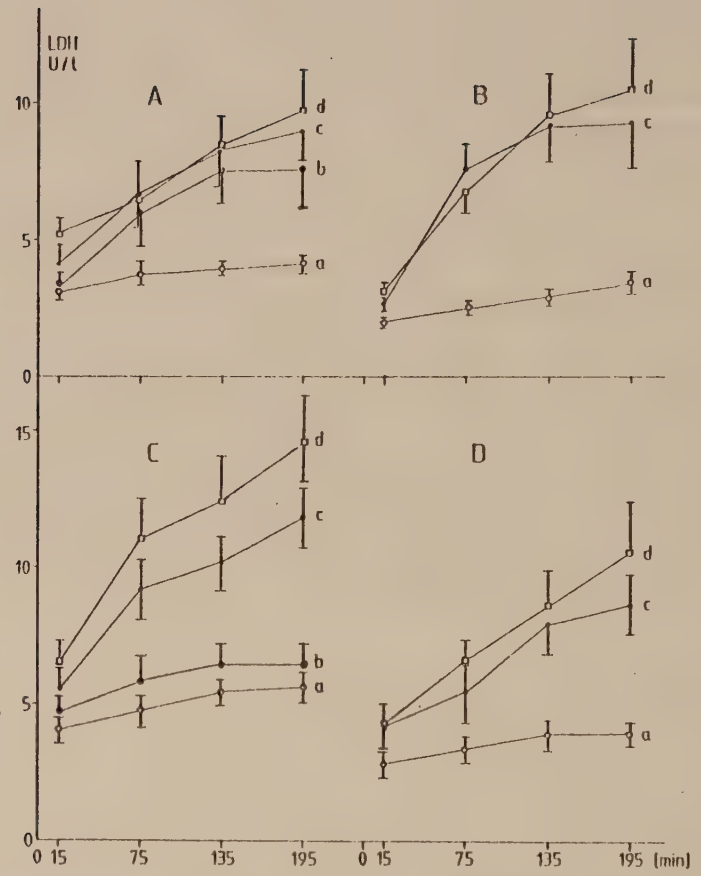


Abbildung 3.8.: Austritt von Lactatdehydrogenase in das Inkubationsmedium während der Inkubation von isolierten Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten ohne Vorbehandlung (A, n=7) und nach chronischer Applikation von Saccharoselösung (B, n=4), Ethanol/Glucose-Lösung (C, n=7) und Ethanol/Saccharose-Lösung (D, n=4) als alleiniger Trinkflüssigkeit. a: endogen durch Inkubation ohne Zusätze, b: Inkubation mit 112 mM Ethanol, c: Inkubation mit 1 mM Bromtrichlormethan, d: gleichzeitiger Zusatz von 112 mM Ethanol und 1 mM Bromtrichlormethan zum Inkubationsmedium.
(Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

4.1.4.3. Austritt der Glutamatdehydrogenase (GlDH)

Nach chronischer Ethanolintoxikation wurden erhebliche Veränderungen der subzellulären Morphologie der Leberzellen beschrieben (Rubin et al., 1968; Matsuzaki et al., 1977). Die auffälligsten Veränderungen wurden in der mitochondrialen Fraktion (Trump und Ericsson, 1965; Iseri et al., 1966) gefunden. Anschwellung, Distortion, erhöhte Dichte der Matrix sowie Schwellung der Christae prägen dabei das Bild. GlDH wird als Markerenzym für Mitochondrien verwendet (Mahler und Cordes, 1966) und sein Austritt ins Inkubationsmedium wurde bereits von Remmer et al., 1977 zur Überprüfung der Integrität von Mitochondrien bei der Inkubation isolierter Hepatozyten bestimmt.

Wie in den Abbildungen gezeigt, wurde auch in den Inkubationen von Zellen aus Ethanol/Glucose- und Ethanol/Saccharose-Lösung trinkenden Ratten sowie bei Zellen aus normal ernährten Kontrolltieren und Saccharose-Lösung trinkenden Vergleichstieren der Austritt von GlDH als Parameter für die Schädigung der mitochondrialen Membran der Hepatozyten bestimmt. Dabei zeigte es sich, daß die Inkubation der Zellen allein zu keinem Austritt an GlDH führte. Auch die Inkubation mit 112 mM Ethanol, die bei Zellen von Kontrolltieren zu einer deutlichen Schädigung der Cytoplasmamembran und Freisetzung von LDH geführt hatte, bewirkte keinerlei zusätzliche Freisetzung dieses latenten Enzyms aus dem Matrixraum der Mitochondrien.

Parallel zu seiner Fähigkeit, Lipidperoxidation auszulösen und die Plasmamembran anzugreifen, zeigte aber BTM einen deutlichen Einfluß. Inkubation mit diesem Agens führte bei Hepatozyten von allen vier Tiergruppen zu einer vermehrten Freisetzung von GlDH, wobei die Werte am höchsten lagen, die mit Zellen aus Ethanol/Glucose-Lösung trinkenden Ratten (Abb. 3.9.) gewonnen worden waren.

Es fällt auf, daß die Zellen aus Ethanol/Saccharose-Tieren deutlich geringere Mitochondrienläsionen nach BTM aufwiesen als Zellen aus Ethanol-Glucose-Tieren. Nur bei Zellen aus normal ernährten Tieren führte die zusätzliche Applikation von 112 mM Ethanol zu einer signifikanten Verstärkung des BTM-Effektes auf die Mitochondrien. Bei Zellen aus den anderen drei Tiergruppen wurde bei der Inkubation mit BTM allein wie auch bei der Inkubation in Kombination mit 112 mM Ethanol ein annähernd gleicher GlDH--Austritt gefunden.

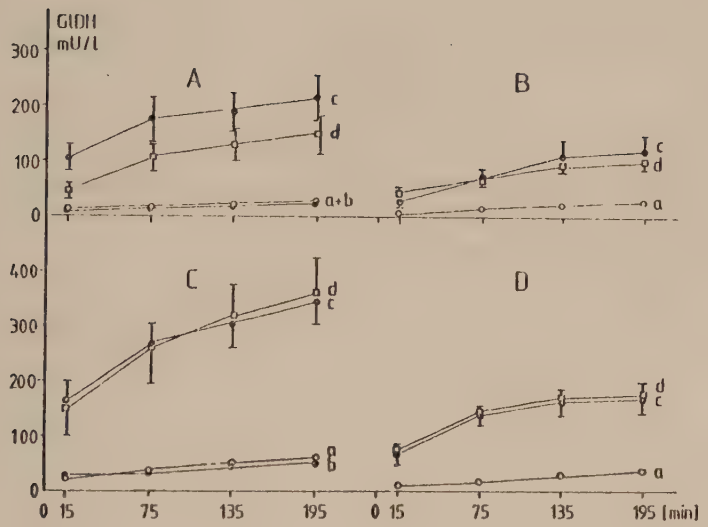


Abbildung 3.9.: Austritt von Glutamatdehydrogenase in das Inkubationsmedium während der Inkubation von isolierten Hepatozyten aus männlichen Wistar Ratten ohne Vorbehandlung (A, n=7) und nach chronischer Applikation von Saccharoselösung (B, n=4), Ethanol/Glucose-Lösung (C, n=7) und Ethanol/Saccharose-Lösung (D, n=4) als alleiniger Trinkflüssigkeit. a: endogen durch Inkubation ohne Zusätze, b: Inkubation mit 112 mM Ethanol, c: Inkubation mit 1 mM Bromtrichlormethan, d: gleichzeitiger Zusatz von 112 mM Ethanol und 1 mM Bromtrichlormethan zum Inkubationsmedium.
(Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

4.1.4.4. Beeinflussung des Glutathiongehaltes während der Inkubation

Für die optimale biochemische Funktion von Hepatozyten ist ihre Ausstattung mit einer Reihe von Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht wie Glutamat (Cornell et al., 1974) und Methionin (Krebs et al., 1976) essentiell. Nach Högberg und Kristoferson (1977) kommt auch dem Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität der Zellen zu.
Parallel zum Anstieg des Malondialdehydspiegels während der Inkubation von Hepatozyten mit ADP-komplexierten Eisenionen beobachteten Högberg et al. (1975a) ein Absinken des intrazellulären GSH-Gehaltes. Auch die Lipidperoxidation mit Cumolhydroperoxyd (Högberg et al., 1975b) und Tetrachlorkohlenstoff (Stacey und Priestley, 1978; Lindström et al., 1978) führte zu einem stärkeren Absinken der GSH-Konzentration als allein bei der Inkubation ohne Zusätze.
Wie in Abb. 3.10 gezeigt, führte auch bei den vorliegenden Versuchen die Inkubation der Hepatozyten aus über Nacht nüchtern gehaltenen Ratten zu einem Absinken des intrazellulären GSH-Spiegels. Eine weitere Reduktion des GSH-Gehaltes wurde durch Zugabe von 112 mM Ethanol zum Ansatz erreicht. Der größte Glutathionverlust wurde aber durch die Applikation von 1 mM BTM erreicht. Die gleichzeitige Inkubation mit 1 mM BTM und 112 mM Ethanol führte dagegen zu keiner weiteren Verarmung an GSH.

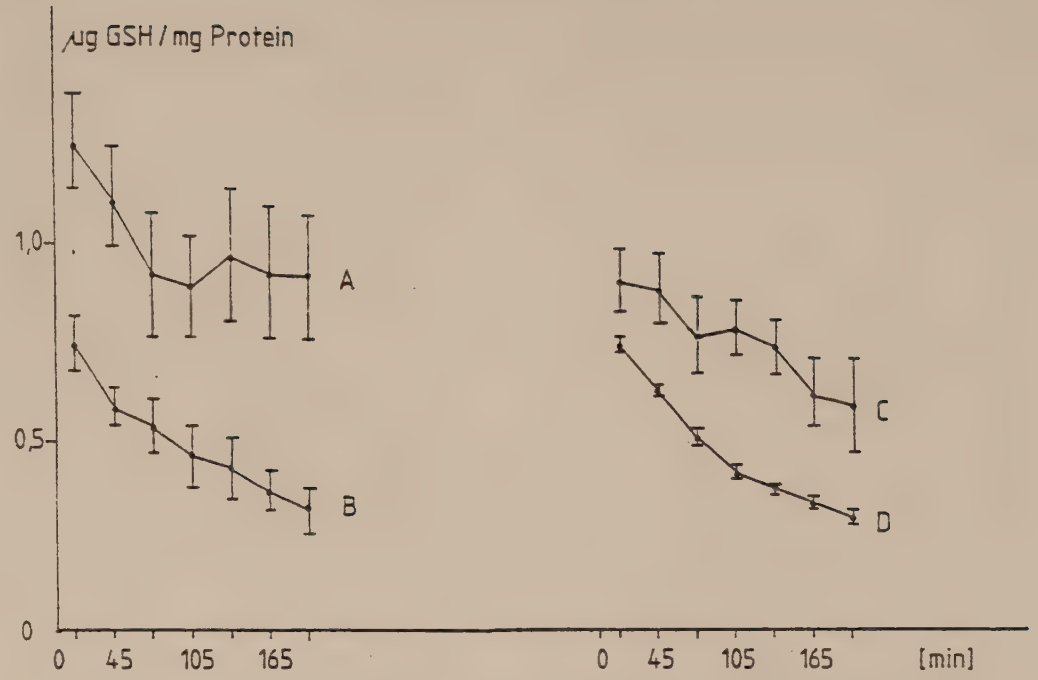


Abbildung 3.10: Abfall der intrazellulären Konzentration an reduziertem Glutathion während der Inkubation von isolierten Hepatozyten aus über Nacht nüchtern gehaltenen männlichen Wistar Ratten.
A: Inkubation ohne Zusätze, B: Inkubation von 1 mM Bromtrichlormethan, C: Inkubation mit 112 mM Ethanol, D: gleichzeitiger Zusatz von 112 mM Ethanol und 1 mM Bromtrichlormethan zum Inkubationsmedium.
(Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n=4)

4.2. Bestimmung des Kohlenwasserstoffgehalts der Atemluft von Labortieren als Indikator für Lipidperoxidation in vivo

Aus der Lebensmittelchemie ist bekannt, daß bei der Autoxidation von Nahrungsfetten kurzkettige, flüchtige Kohlenwasserstoffe entstehen (Fränkel et al., 1961). Wie Horvat et al. (1964) zeigen konnten, entstehen Kohlenwasserstoffe dabei aus den in den Nahrungsfetten enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Mit Metyllinoleat als Modellsubstanz fanden diese Autoren Methan, Ethan, Propan, Butan und Pentan als Peroxidationsprodukte. Dumelin und Tappel (1977) beobachteten, daß Kohlenwasserstoffe nicht direkt während der Peroxidation von Fettsäuren, sondern erst beim Zerfall der Peroxidationsprodukte vermittels Katalyse durch Schwermetallionen entstehen. Dies wurde durch Donovan und Menzel (1978) bestätigt, die bei der Behandlung von Methyl-13-hydroperoxy-6,9,11-octatrienoat mit Eisenionen eine quantitative Umsetzung dieses Esters zu n-Pentan beobachteten.

Riley et al. (1974) benutzten als erste das Auftreten von Ethan und Dillard et al. (1977) das Auftreten von Pentan in der Atemluft von Labortieren als Indikator für Lipidperoxidation in vivo. Tappel (1980) faßte die weiteren, bisher in vivo gemessenen Befunde über die Beeinflussung der Kohlenwasserstoffkonzentrationen in der Atemluft nach Vitamin E-Verarmung, Selenmangel und Behandlung mit Antioxidantien, Tetrachlorkohlenstoff, Ozon und Ethanol zusammen.

Vor der Durchführung der unten beschriebenen Versuche wurde zunächst die gaschromatographische Analytik der Atemluft so verbessert, daß eine isotherme Auftrennung der Kohlenwasserstoffe innerhalb von zwanzig Minuten möglich wurde. Dies wurde durch den Einsatz einer Edelstahlsäule (Innendurchmesser: 3 mm) mit Porasil C als Füllung sowie Befeuchtung des Trägergases mit Natriumdekahydrat erreicht

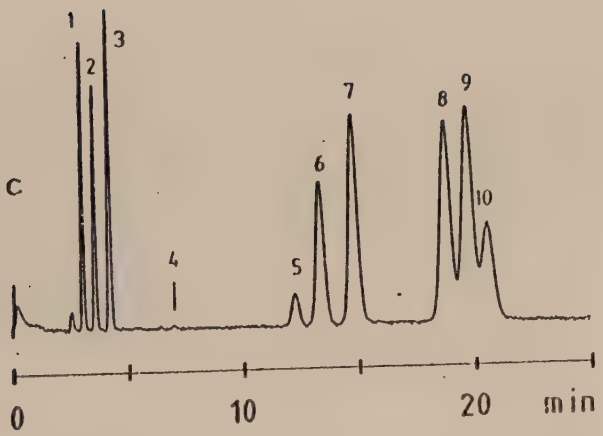


Abbildung 3.11.: Gaschromatographische Auftrennung von 6 ml Eichgasmischung aus flüchtigen Kohlenwasserstoffen (≈0.5 ppm) auf einer Porasil C-Säule (5m x 3mm) bei 60°C isotherm. Flammenionisationsdetektor, Dämpfung des Elektrometers: x 32. 1 = Ethan, 2 = Ethylen, 3 = Propan, 4 = n-Butan, 5 = i-Pentan, 6 = n-Pentan, 7 = 1-Buten, 8 = trans-2-Buten, 9 = i-Buten, 10 = cis-2-Buten.

(Frank et al., 1980a, 1980b). Abb. 3.11. zeigt ein Chromatogramm mit Referenzgasen, das mit Hilfe dieser Säule gewonnen worden ist. Porasil C trennt die Kohlenwasserstoffe nach Molekulargewicht, Wasserstoffsättigung und Isomerie.

4.2.1. Lipidperoxidation durch Bromtrichlormethan in vivo

Bromtrichlormethan (BTM) ruft in vivo eine starke Kohlenwasserstoffabatmung bei Ratten hervor. Wegen der guten Korrelation der Ethanfreisetzung in vivo (Köster et al., 1978) mit der in vitro beobachteten Malondialdehydbildung in Lebermikrosomen und der Pentanfreisetzung mit der Dienkonjugatbildung in der Leber in vivo (Sagai und Tappel,1979) wurde diese Substanz zur Testung des Exsikkatorsystems verwendet.

Wurden nämlich männliche Wistar Ratten nach einer intraperitonealen Dosis von 100 mg BTM pro Kilogramm Körpergewicht in den Exsikkator gebracht, so ließ sich im Vergleich zu unbehandelten Tieren bereits nach 15 Minuten eine deutliche Erhöhung der Kohlenwasserstoffkonzentration im Gasraum beobachten, wie das Originalchromatogramm in Abb. 3.12. zeigt. Besonders Ethan und n-Pentan steigen an. Verfolgt man diesen Anstieg nach Gabe steigender BTM-Dosen über die Zeit, so erhält man die in Abb. 3.13. dargestellten Kurven. Besonders deutlich sind die fast parallelen Kurven für Ethan und n-Pentan während der ersten Stunde für die beiden hohen BTM-Dosen, während die Erhöhung von Ethylen wesentlich geringer ausfällt. Hier, wie auch bei Propan liegen die Konzentrationen nach 25 mg BTM pro Kilogramm Körpergewicht im Bereich der Gasproduktion von unbehandelten Kontrollratten. Trägt man die Kohlenwasserstoffkonzentrationen, die eine Stunde nach BTM-Applikation im Exsikkator gemessen worden sind, gegen die verabreichte Dosis auf, so erhält man die in Abb. 3.14. dargestellte Dosiswirkungskurve.

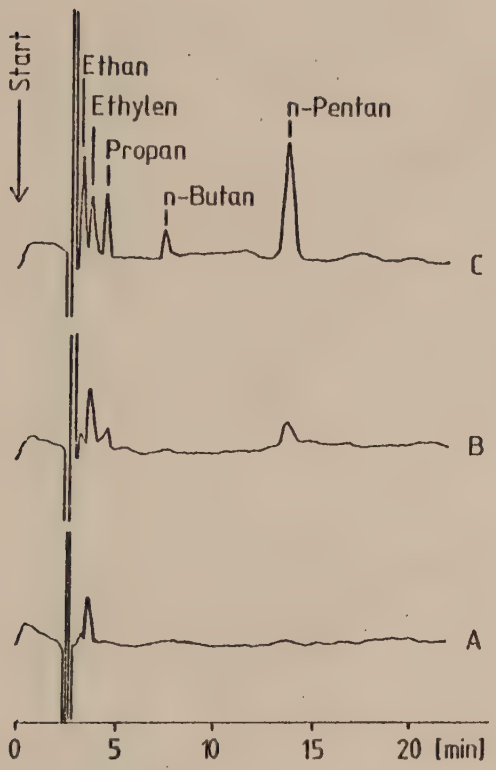


Abbildung 3.12.: Gaschromatographische Auftrennung einer Luftprobe aus dem Gasraum des Ganzglasexsikkatorsystems, das mit einer über Nacht nüchtern gehaltenen männlichen Wistar Ratte besetzt ist. A: Kohlenwasserstoffgehalt zu Beginn des Experiments, B: Akkumulation während 15 Minuten bei unbehandeltem Tier, C: Akkumulation während 15 Minuten nach intraperitonealer Injektion von Bromtrichlormethan (100 mg/kg).

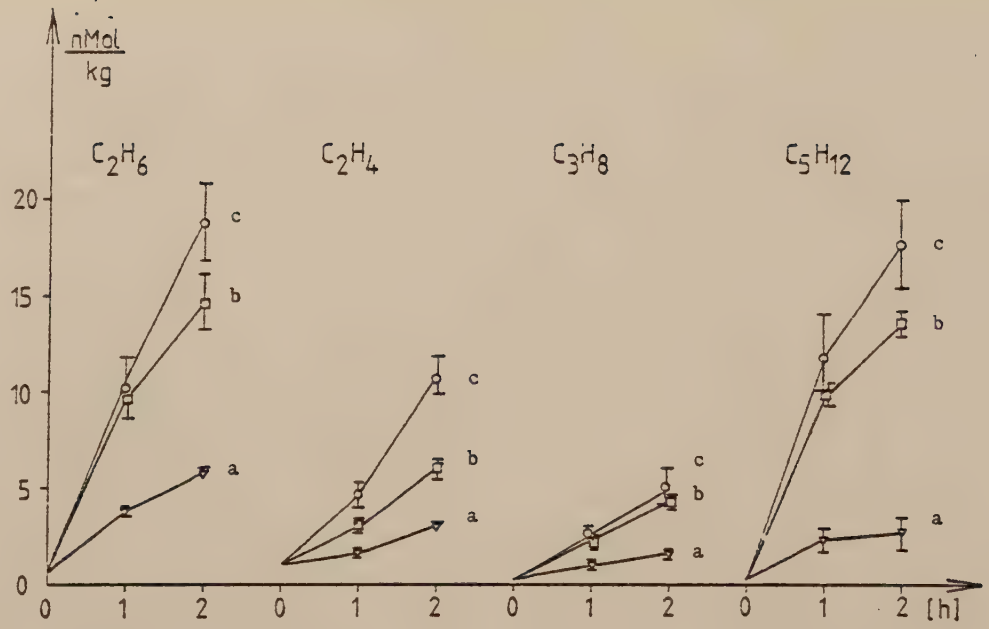


Abbildung 3.13: Zeitlicher Verlauf der Akkumulation flüchtiger Kohlenwasserstoffe aus der Atemluft einer männlichen Wistar Ratte im Ganzglasexsikkatorsystem nach intraperitonealer Injektion von Bromtrichlormethan.
a: 25 mg/kg, n=3; b: 50 mg/kg, n=5; c: 100 mg/kg, n=5; Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

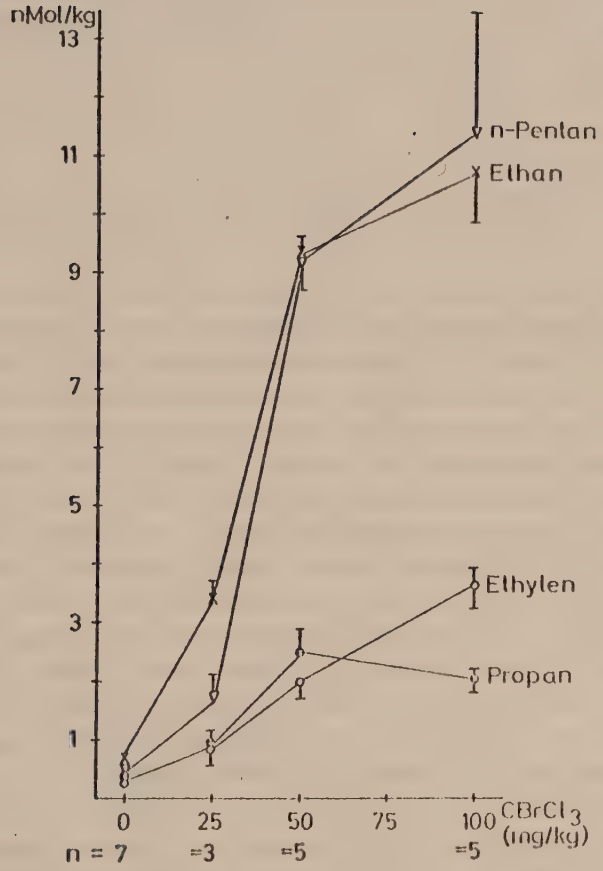


Abbildung 3.14: Kohlenwasserstoffabatmung einer nüchternen männlichen Wistar Ratte während einer Stunde: Einfluß der intraperitonealen Injektion steigender Bromtrichlormethanmengen.

Während die Ethylenabgabe mit der Dosis linear ansteigt, zeigen Ethan-, Propan- und Pentanproduktion bei den höheren Dosierungen Sättigungscharakteristik. Aus dieser Abbildung wird deutlich, daß die Applikation von BTM in vivo besonders zur Freisetzung von Ethan und Pentan als Ausdruck der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren führt.

4.2.2. Kohlenwasserstoffabatmung nach akuter Ethanolintoxikation

Di Luzio (1966, 1973) postulierte, daß Ethanol seine hepatotoxische Wirkung via Lipidperoxidation ausübt. In der Folgezeit konnte bei Rattenmitochondrien nach Ethanolapplikation in vivo eine vermehrte Dienkonjugation als Zeichen von Lipidperoxidation beobachtet werden (Di Luzio und Hartman, 1969; MacDonald, 1973; Reitz, 1975). Diese Befunde wurden aber von Hashimoto und Recknagel (1968) und Scheig und Klatskin (1969) angezweifelt. Köster et al. (1977) fanden vermehrte Ethanexhalation nach akuter Administration von 5g Ethanol pro kg bei Ratten, erhöhte Pentanabgabe wurde von Litov et al. (1978) nach Ethanolbehandlung von Ratten gezeigt, die mit Vitamin E-freiem Futter ernährt worden sind. Bei diesen Experimenten zeigten aber bereits die Vitamin-E-Mangeltiere, die als Lösungsmittelkontrolle physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, eine 15mal höhere Pentanabatmung als normal ernährte Tiere. Auch konnte nach Wiederaufnahme der Fütterung mit Vitamin E-reicher Diät die erhöhte Pentanangabe nach Ethanolapplikation zum Verschwinden gebracht werden.

In den hier beschriebenen Experimenten erhielten männliche Wistar Ratten nach 24-stündigem Fasten eine einmalige Ethanoldosis von 5g/kg per os. Nach einer weiteren Adaptionsperiode von 0,5 h, in der die Resorption des Ethanols und seine Verteilung im Körper des Tieres begann, und die wäh-

rend des Versuchs vorliegende Blutalkoholkonzentration von 2.25 ± o.45 g/l ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) erreicht wurde - die Versuchstiere zeigten deutliche Zeichen der Sedierung - wurden sie in dem Exsikkatorsystem eingeschlossen. Kontrolltiere erhielten eine gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung.

Wie in Abb. 3.15 dargestellt, zeigt ein Originalchromatogramm der Luft im Exsikkator zu Beginn der Meßreihe nur geringe Spuren von Kohlenwasserstoffen. Ein vierstündiger Aufenthalt von Ratten, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, führt nur zu einer geringfügigen Akkumulation von Kohlenwasserstoffen. Hatten die Tiere jedoch vor der Einschließung in das Exsikkatorsystem Ethanol erhalten, so konnte eine deutliche Vermehrung des Kohlenwasserstoffgehalts im Gasraum verzeichnet werden. Neben einem starken Anstieg an Ethan, Ethylen, Propan, n-Butan und n-Pentan wurde ein bisher bei der Lipidperoxidation nicht beobachteter Kohlenwasserstoff, nämlich 1-Buten, gefunden. Seine Identität wurde mit Hilfe der Gaschromatographie/ Massenspektroskopie und durch Retentionszeitmessung mit Vergleichssubstanzen bestimmt. Den Verlauf des Konzentrationsanstiegs der Kohlenwasserstoffe im Gasraum des Exsikkators während der Meßperiode zeigt Abb. 3.16.
Während besonders die längerkettigen Kohlenwasserstoffe ab Propan nach einem initialen Anstieg für den Rest der Meßzeit jeweils auf eine Plateaukonzentration einschwenken, zeigt sich nach Ethanolgabe bei allen gezeigten Kohlenwasserstoffen ein linearer Anstieg. Wegen dieser Sättigungscharakteristik wurde von nun an der Anstieg während der ersten Stunde als Maß für die Kohlenwasserstoffentwicklung benutzt.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurden auch weibliche Wistar Ratten untersucht. Im Vergleich zu männlichen Ratten zeigten sie weder nach Gabe von physiologischer Kochsalzlösung noch nach Ethanolapplikation nennenswerte Ethan- oder Ethylenabatmung (Abb. 3.17).

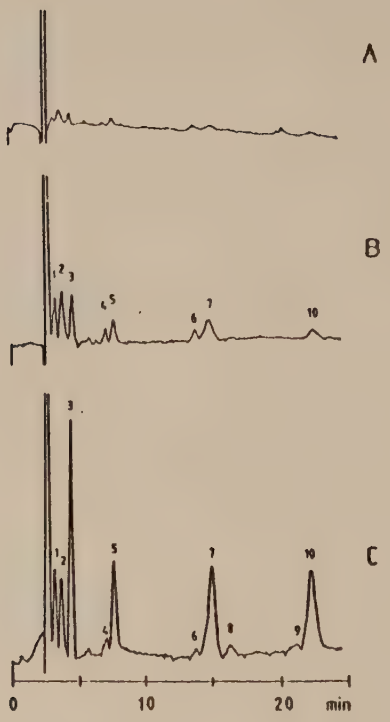


Abbildung 3.15.: Gaschromatogramme von Proben aus dem Gasraum des Exsikkators, der eine nüchterne, männliche Wistar Ratte enthielt. A: Start der Kollektionsperiode, B: Akkumulation von Kohlenwasserstoffen während 4 Stunden bei unbehandeltem Tier, C: Akkumulation während 4 Stunden, wenn die Ratte 0,5 Stunden vor Beginn der Kollektionsperiode eine akute Ethanolgabe (5g/kg p.o.) erhalten hatte.
1 Ethan; 2 Ethylen; 3 Propan; 4 i-Butan; 5 n-Butan; 6 i-Pentan; 7 n-Pentan; 8 1-Buten; 9 trans-2-Buten; 10 i-Buten.

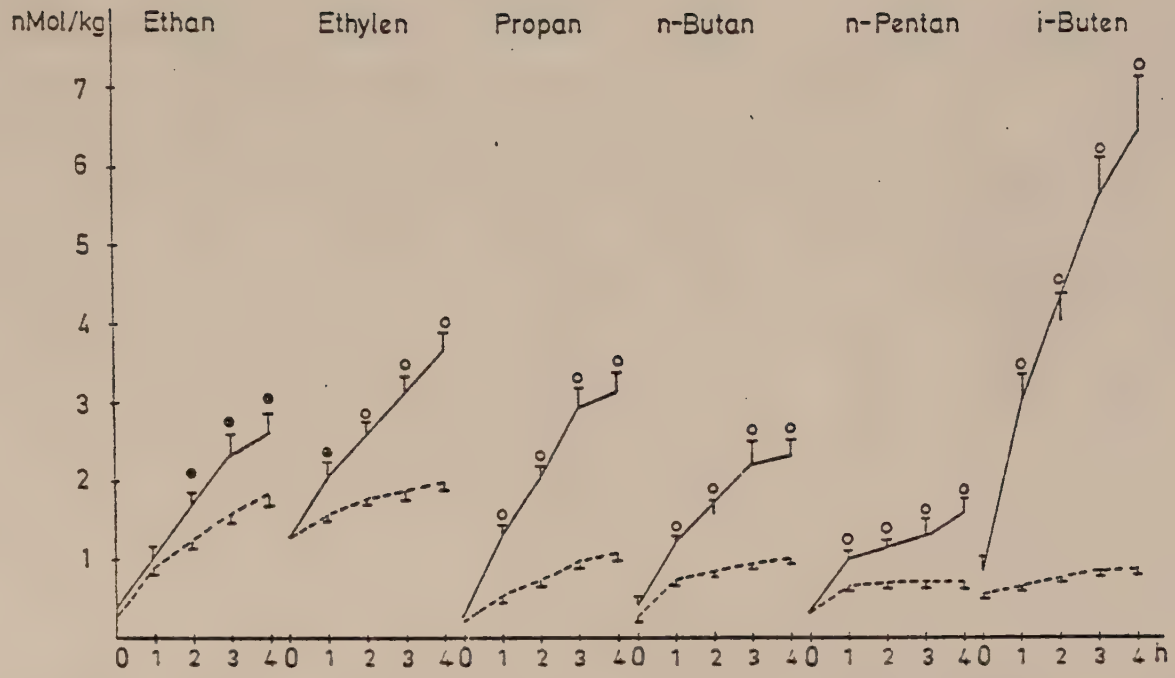


Abbildung 3.16.: Zeitverlauf der Akkumulation von Kohlenwasserstoffen aus der Atemluft nüchterner, männlicher Wistar Ratten, die 0.5 h vor der Sammelperiode Ethanol (5g/kg p.o., durchgezogene Linie) oder Saline (gestrichelt) erhalten haben.
•: $p < 0,05$; o: $p < 0,01$; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=7$.

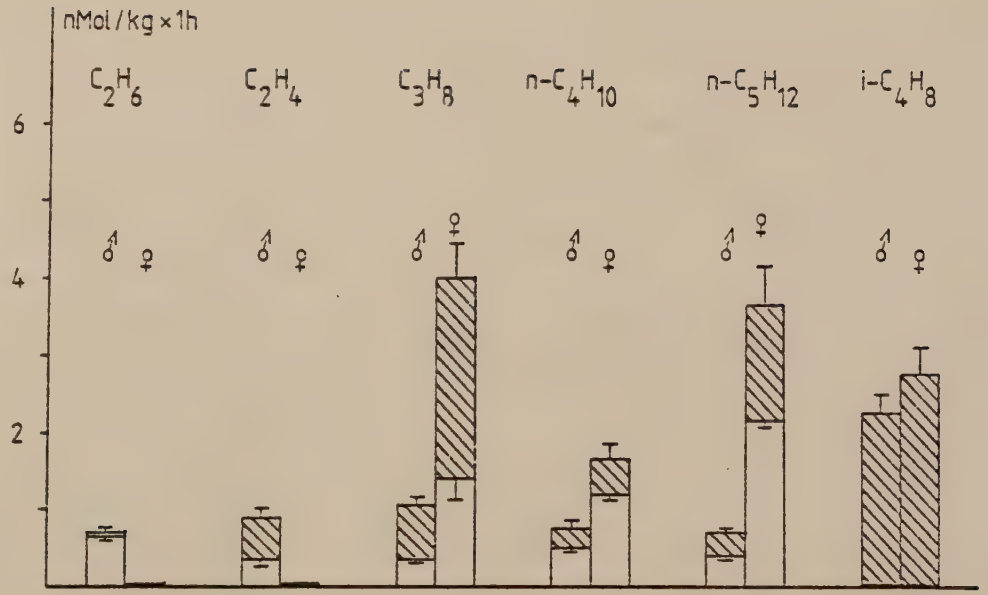


Abbildung 3.17.: Geschlechtsunterschiede bei der Kohlenwasserstoffabatmung durch Wistar Ratten.

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; männlich: n=7; weiblich: n=8.

Die nicht mehr auswertbaren Konzentrationen waren niedriger als 0,5 nMol pro Kilogramm Körpergewicht während der ersten Stunde. Dagegen atmeten weibliche Ratten nach physiologischer Kochsalzlösung, besonders aber nach Ethanolgabe deutlich mehr Propan, n-Butan und n-Pentan ab.
Die i-Butan-Produktion war bei männlichen und weiblichen Ratten unter diesen Bedingungen gleich: Ohne Ethanol konnte nur ein geringfügiger Anstieg von 0,5 nMol/kg während einer Stunde bestimmt werden. Ethanolbehandlung dagegen führte zu einer starken Abatmung dieses Kohlenwasserstoffs.

4.2.3. Spezlesunterschiede

Strubelt et al. (1974) haben bei Meerschweinchen eine höhere hepatotoxische Wirkung von Ethanol als bei Ratten gefunden. Deshalb wurde diese Spezies zur Bestimmung der Kohlenwasserstoffexhalation herangezogen. Es erwies sich, daß diese Tiere eine derart hohe physiologische Methankonzentration in der Atemluft haben, daß die Messung von Ethan, Ethylen und Propan in ihrer Atemluft durch Überlagerung der Peaks dieser Kohlenwasserstoffe durch den Methanpeak unmöglich wurde. Deshalb finden sich in Abb. 3.18. auch keine Angaben für die Ethan-, Ethylen- und Propanexhalation durch Meerschweinchen. Es konnte aber gezeigt werden, daß nicht nüchterne Meerschweinchen sowohl ohne als auch nach Ethanolbehandlung mehr n-Butan und n-Pentan abatmeten als Ratten. Ohne Ethanolbehandlung zeigen auch Tiere dieser Nagerspezies nur eine geringfügige i-Butenabatmung. Nach einer akuten Ethanolgabe zeigt ihre Atemluft die doppelte i-Butankonzentration als die von gleichbehandelten Ratten.

Abb. 3.18. zeigt ebenfalls die Kohlenwasserstoffexhalation von nicht nüchternen NMRI-Mäusen. Diese wurden zu je vier Tieren in den Exsikkator gesetzt und atmen mit und ohne Ethanol-

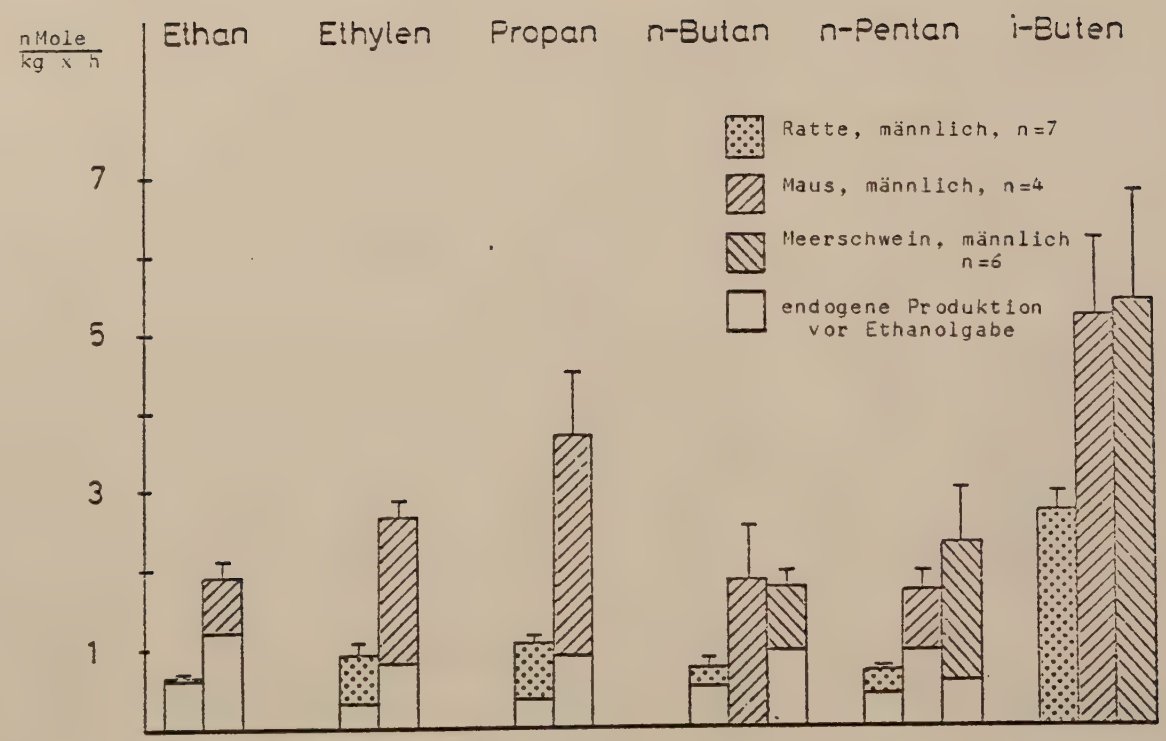


Abbildung 3.18.: Speziesabhängige Induktion der Kohlenwasserstoffabatmung durch akute Ethanolgabe (5g/kg, p.o.) 0,5 h vor Beginn der Kollektionsperiode. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

behandlung mehr Ethan und n-Pentan ab als Ratten. Ohne Ethanolintoxikation enthielt ihre Atemluft so viel Ethylen, Propan und n-Pentan wie bei Ratten unter Ethanoleinfluß. n-Butan konnte in der Gasphase des Exsikkators erst nach Ethanolgabe an die Mäuse beobachtet werden. Wie auch die Meerschweinchen zeigten diese Tiere nur eine geringfügige i-Butenabatmung nach Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung, unter Ethanolbehandlung dagegen produzierten sie die doppelte Menge an i-Buten, wie Ratten.

4.2.4. Einfluß der Fütterung

In den soeben geschilderten Versuchen waren nicht nüchterne Mäuse und Meerschweinchen verwendet worden. Um zu zeigen, welchen Einfluß der Fütterungszustand auf die Kohlenwasserstoffproduktion hat, wurden männliche NMRI-Mäuse nach einem Futterentzug über 12 Stunden mit 5g Ethanol pro Kilogramm Körpergewicht behandelt und dann die Kohlenwasserstoffakkumulation dieser Tiere im Exsikkator verfolgt. Dabei zeigte sich (Abb. 3.19.), daß nur zwei Gase von dieser Behandlung betroffen wurden: Die n-Pentan-Produktion entspricht der, die bei gefütterten Mäusen ohne Ethanolbehandlung gefunden wurde, die durch Ethanol ausgelöste i-Butenproduktion erfährt durch diese Behandlung eine Steigerung um 45 Prozent.

4.2.5. Vorbehandlung mit Phenobarbital

Phenobarbitalvorbehandlung führt zur Vermehrung der Enzyme der Elektronentransportkette in Lebermikrosomen (Greim und Remmer, 1965). Da in vitro beobachtet wurde, daß Wasserstoffperoxyd ein Produkt dieser Enzyme sein kann (Hildebrand et al., 1973), wurde der Einfluß von Phenobarbital auf die Kohlenwasserstoffprodukiton untersucht. Dazu erhielten männliche NMRI-Mäuse für 4 Tage je einmal täglich 100 mg Phenobarbital pro Kilogramm Körpergewicht i.p. Am 5. Tag wurde zunächst die Kohlenwasserstoffabatmung ohne Ethanolapplikation bestimmt (Abb. 3.20). Danach erhielten die Tiere 2g Ethanol pro kg p.o. und nach einer Adaptionsphase von 0,5 Stunden wurde erneut die Kohlenwasserstoffabgabe bestimmt. Dabei zeigte die Phenobarbitalvorbehandlung keinen Einfluß auf die Kohlenwasserstofffreisetzung ohne zusätzliche Ethanolgabe. Auch die Gasentwicklung nach Ethanolapplikation wurde durch diese Vorbehandlung nicht verändert.

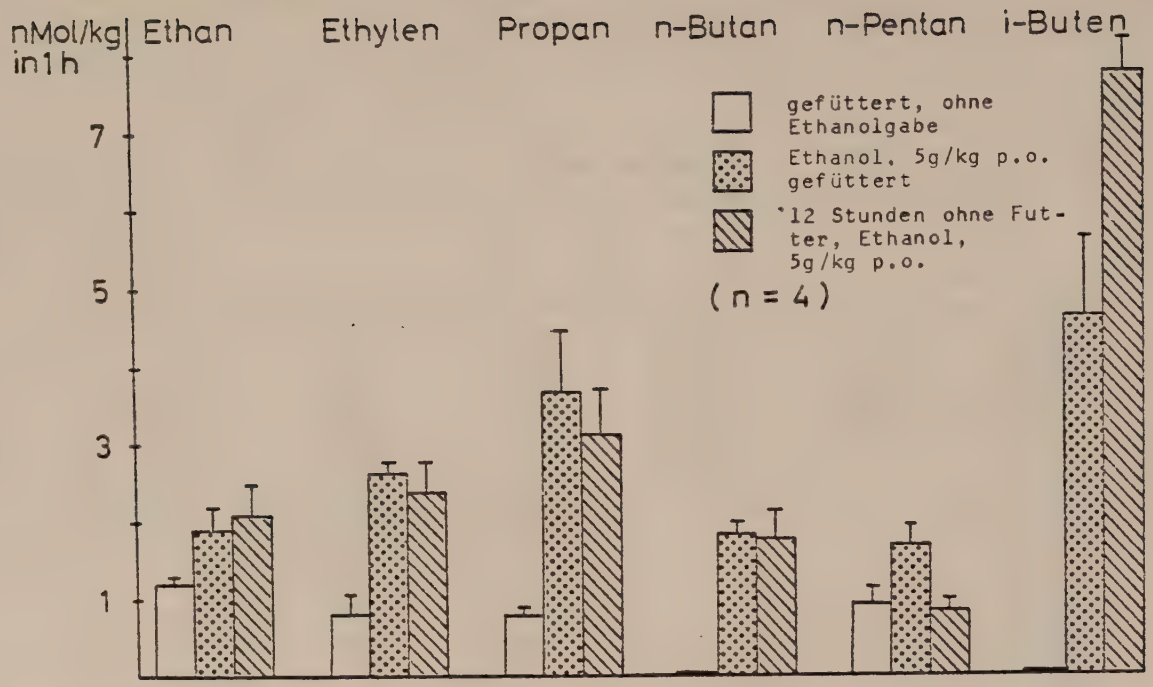


Abbildung 3.19.: Einfluß der Fütterung auf die Kohlenwasserstoffexhalation durch männliche NMRI Mäuse.

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

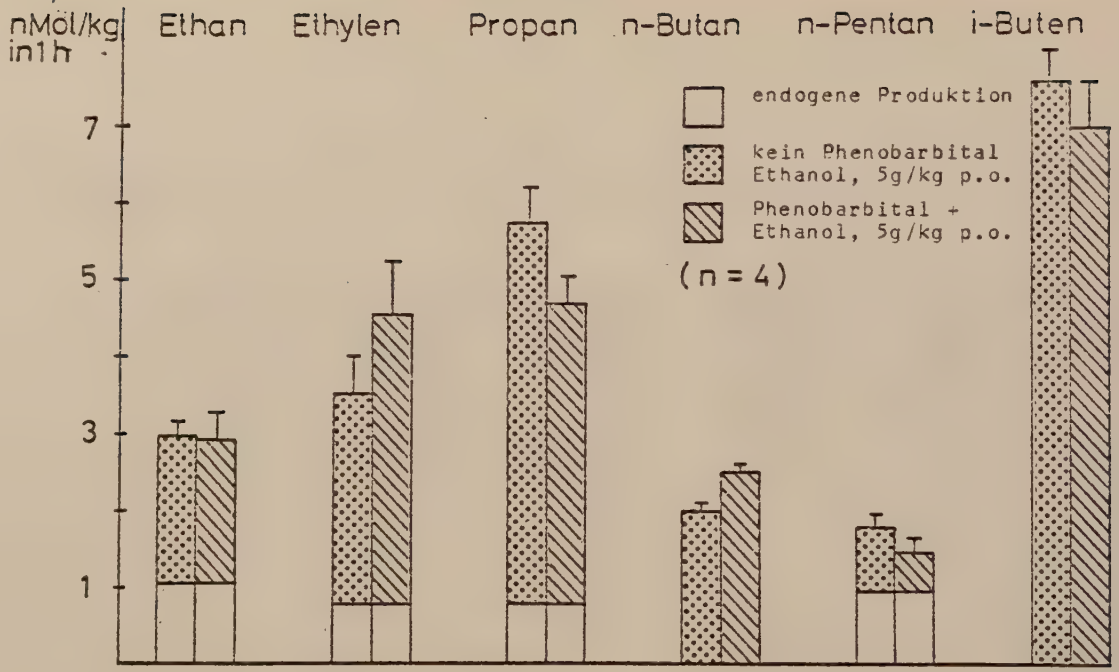


Abbildung 3.20: Einfluß der Vorbehandlung mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p., 1 x täglich für 4 Tage) auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch männliche NMRI Mäuse.
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

4.2.6. Einfluß unterschiedlicher Ethanoldosen

Wurden gefütterte männliche NMRI-Mäuse mit unterschiedlichen Ethanoldosen (1 - 5g/kg p.o.) behandelt, so führte dies bei den Versuchstieren zu den in Abb. 3.21. dargestellten Blutalkoholwerten.
Die Akkumulation von Kohlenwasserstoffen während des Zeitraums von 0,5 bis 1,5 Stunden nach Ethanolgabe ist in Abb. 3.22. gezeigt. Danach erhöhen alle Ethanoldosen die Produktion der Kohlenwasserstoffe signifikant über die nach physiologischer Kochsalzlösung beobachteten Werte. Auffällig ist der Befund, daß die Gabe von 2g/kg jeweils zu den höchsten Anstiegen der Kohlenwasserstoffkonzentration führt. Ethanol zeigt in diesem Versuch keine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung.

4.2.7. Einfluß unterschiedlicher Diethyldithiocarbamatdosen

Disulfiram wird zur Therapie des Alkoholismus eingesetzt. Im Organismus wird diese Dithioverbindung rasch zu Diethyldithiocarbamat reduziert (Strömme, 1965). Da letztere Verbindung leicht wasserlöslich ist, wurde sie statt Disulfiram in einer Dosierung von 30 - 300 mg/kg i.p. appliziert. Nach dieser Behandlung zeigten männliche nüchterne Sprague-Dawley Ratten das in Abb. 3.23. dargestellte Kohlenwasserstoffexhalationsmuster. Alle Diethyldithiocarbdosen führten zu einer signifikanten Erhöhung der Kohlenwasserstoffabatmung, wobei aber nur bei n-Pentan eine Dosis- Wirkungs-Beziehung erkennbar wird. Wie auch Ethanol, führt die Behandlung mit Diethyldithiocarbamat zu einem massiven Auftreten von i-Buten.
Während der Behandlung mit Diethyldithiocarbamat konnte in der Atemluft der Versuchstiere noch eine weitere Substanz beobachtet werden. Ihr Peak lag zwischen n-Butan und n-Pentan. Durch Vergleich der Retentionszeiten konnte diese Substanz als Kohlendisulfid, ein Metabolit von Diethyldithiocarbamat (Haley, 1979), identifiziert werden.

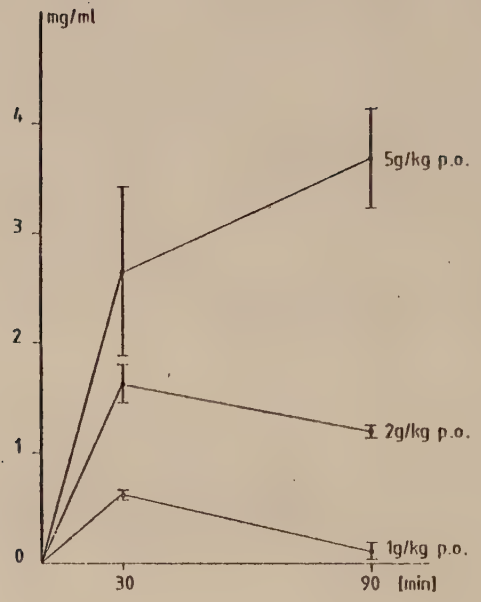


Abbildung 3.21.: Blutalkoholspiegel von männlichen NMRI Mäusen nach oraler Applikation steigender Ethanoldosen.
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n=4

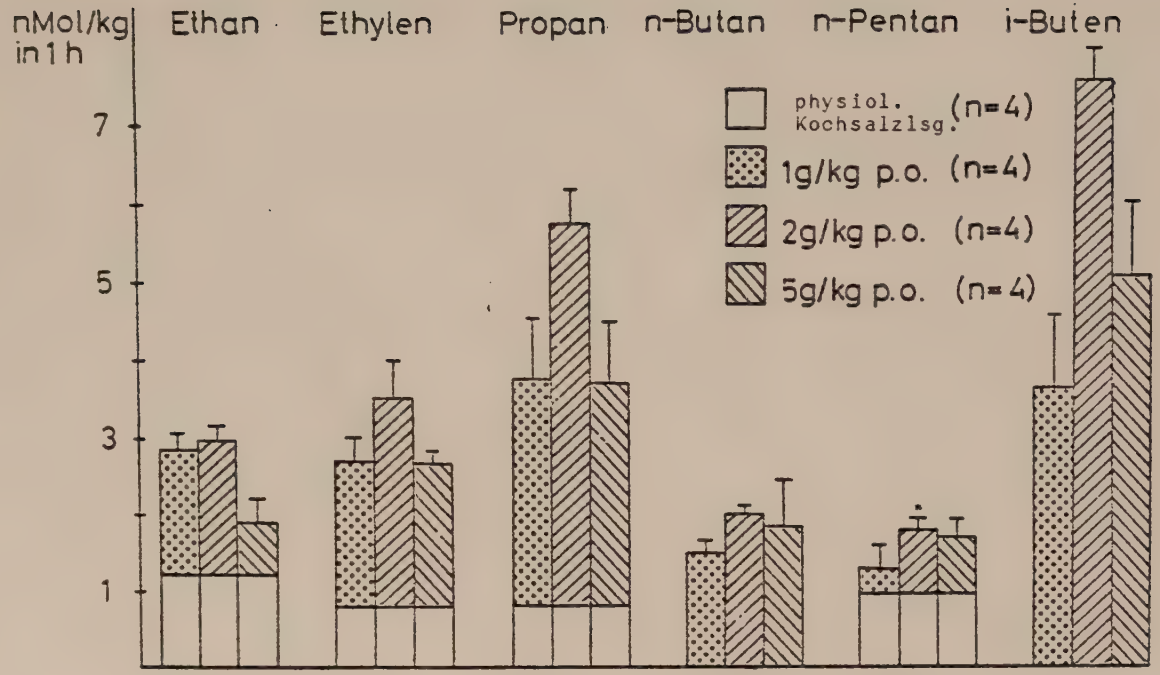


Abbildung 3.22.: Einfluß steigender Ethanoldosen, die 0,5 h vor Beginn der Kollektionsperiode appliziert worden sind, auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch männliche NMRI Mäuse.
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

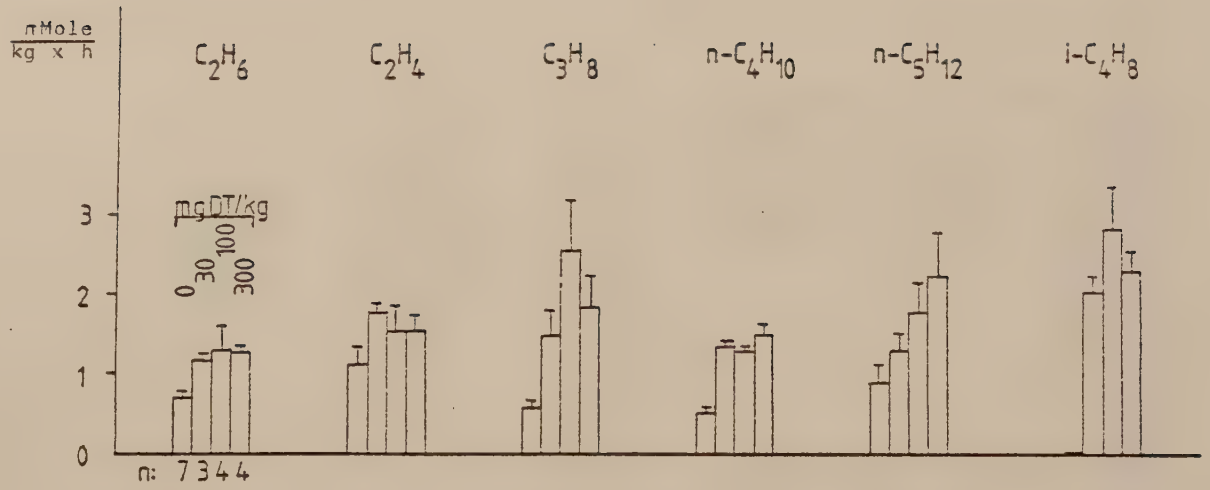


Abbildung 3.23.: Einfluß der Applikation steigender Dosen von Diethyldithiocarbamat (DT) 0,5 h vor Beginn der Kollektionsperiode auf die Exhalation flüchtiger Kohlenwasserstoffe durch nüchterne männliche Sprague-Dawley Ratten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

4.2.8. Chronische Ethanolbehandlung und Kohlenwasserstoffabgabe

In einem ersten Versuch wurden männliche Wistar-Ratten nach einer Adaptionsphase von zwei Wochen, in der die Ethanolkonzentration in ihrer Trinkflüssigkeit täglich um ein Prozent (v/v) erhöht worden war, 3 bis 4 Wochen lang mit einer Ethanollösung von 15% (v/v) als Getränk behandelt. Nach Absetzen des Ethanols erhielten die Tiere 24 Stunden lang Trinkwasser, aber kein Festfutter. Wurden sie dann in das Exsikkatorsystem gebracht, so konnte in ihrer Atemluft folgendes beobachtet werden:
Die Tiere entwickelten außerordentlich hohe Methanmengen. Dabei war der auf der Porasil-C-Säule gefundene Peak so groß, daß er die Ethan- und Ethylen-Peaks vollständig überlagerte. Daher konnten nur die in Abb. 3.24 dargestellten Gase ausgewertet werden. Es zeigte sich, daß Ethanol trinkende Tiere sowohl ohne als auch nach einer zusätzlichen akuten Ethanoldosis (5g/kg, p.o.) mehr Propan abatmeten als Ratten, die nur Wasser als Getränk erhalten hatten. Das gleiche gilt für die n-Pentanabatmung. Auf die n-Butanfreisetzung hatte die Ethanolvorbehandlung keinen Einfluß. Auch ist die erniedrigte i-Butenproduktion nach vorheriger akuter Ethanolgabe bei den Trinkern nicht signifikant gegenüber den normal ernährten Kontrollen.

In einem zweiten Experiment erhielten weibliche Wistar Ratten nach einer zwei Wochen dauernden Adaptionsphase mit steigender Ethanol- bzw. Saccharosekonzentration 12 Wochen lang 20% Ethanol oder 26,9% Saccharose im Trinkwasser (Wachstumskurve Abb. 3.23a). Wurden die Tiere von dieser Diät abgesetzt und erhielten über Nacht Wasser als Getränk, aber kein Festfutter, so konnte in ihrer Atemluft folgendes Kohlenwasserstoffmuster beobachtet werden:

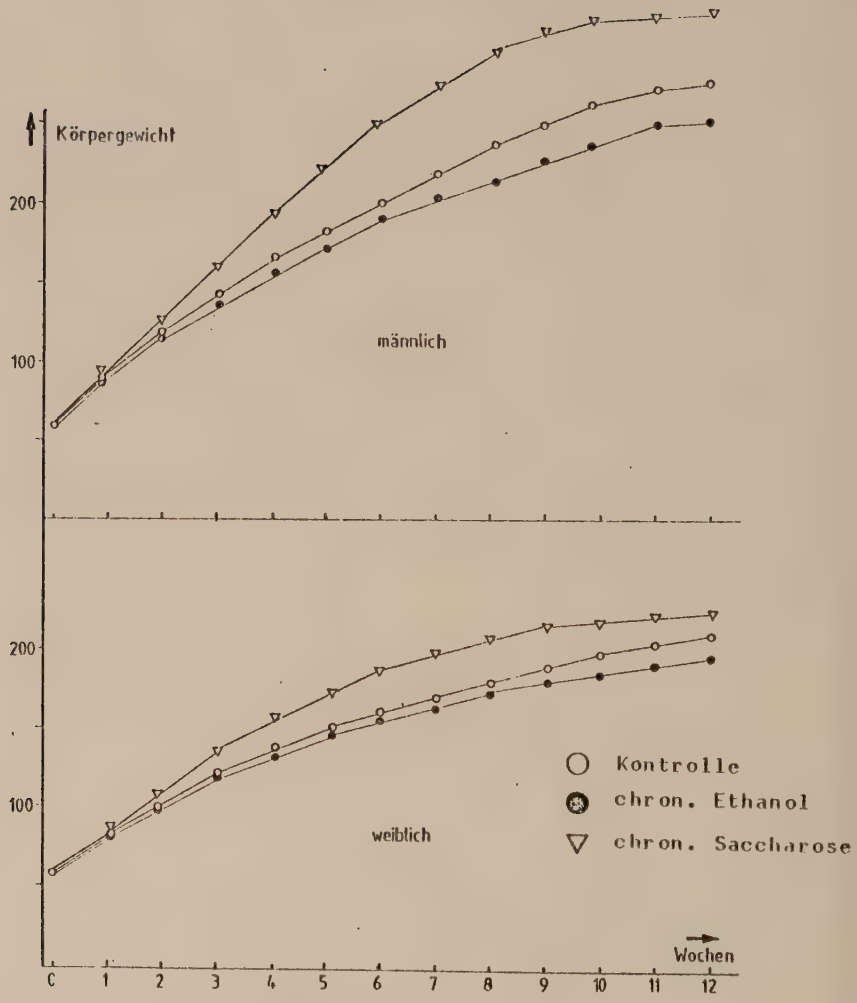


Abbildung 3.23a.: Wachstumsverlauf bei Wistar Ratten bei Haltung mit unterschiedlichen Diäten
Kontrolle: Altromin C 1320 Trinkwasser
Chron.Ethanol: Altromin C 1320 und Ethanollösung (16% w/v) als Getränk
Chron. Saccharose: Altromin C 1320 und Saccharoselösung (26,9% w/v) als Getränk
(Mittelwerte von je 10 Tieren).

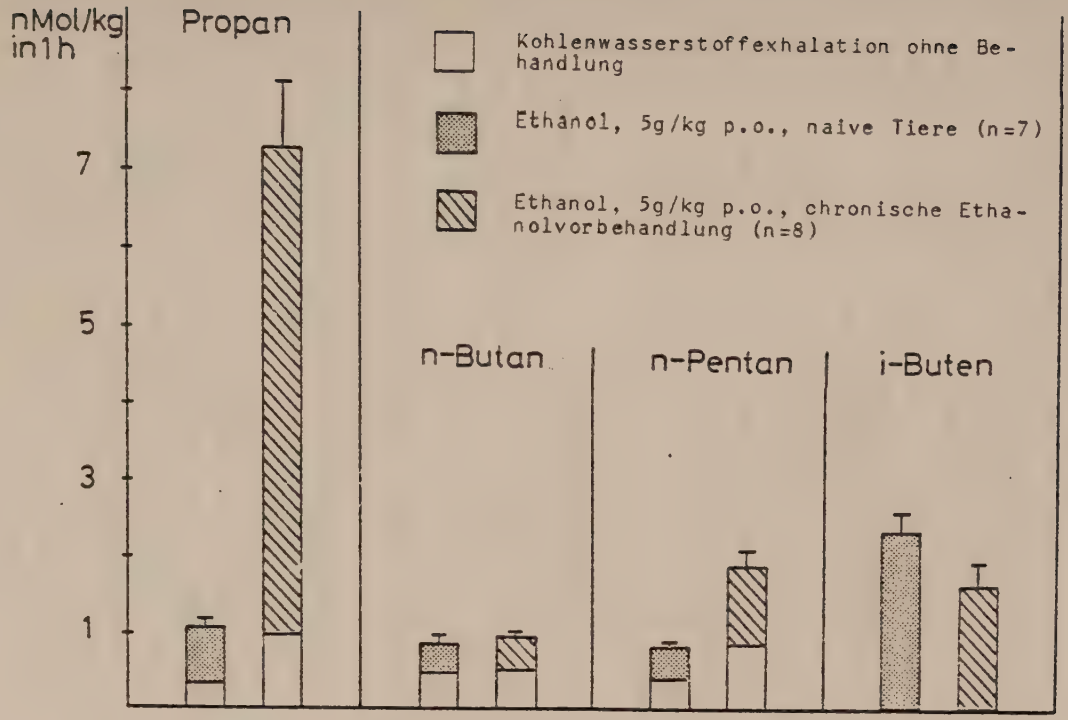


Abbildung 3.24.: Chronische Vorbehandlung mit Ethanollösung (15%, v/v): Einfluß auf die Kohlenwasserstoffabatmung nüchterner männlicher Wistar Ratten ohne sowie nach zusätzlicher, akuter Ethanolgabe 0,5 h vor Beginn der Kollektionsperiode. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Wie in Abb. 3.25. gezeigt, atmeten die Ethanoltiere nach einer Diethyldithiocarbamatgabe (100 mg/kg i.p.) aber auch ohne diese zusätzliche Behandlung (in der Abbildung nicht dargestellt) im Vergleich zu den Saccharosetrinkern massive Mengen an Methan ab.
Trotz Diethyldithiocarbamatinjektion 30 Minuten vor Beginn der Messung konnte in der Atemluft beider Tiergruppen nur eine geringe Menge an Ethan und Ethylen nachgewiesen werden, die nicht mehr quantifizierbar war.
Weiterhin zeigte sich, daß die Ethanolbehandlung im Vergleich zur Behandlung mit Saccharoselösung als Getränk keinen Einfluß auf die unter Diethyldithiocarbamat meßbare Freisetzung von Propan, n-Butan und n-Pentan hat. Auch die Diethyldithiocarb-induzierte Abatmung von 1-Buten war nach Ethanol- und Saccharosebehandlung gleich, wie Tabelle 3.2. zeigt.
Wurden männliche Wistar Ratten der gleichen chronischen Behandlung mit Ethanol unterzogen, wie soeben für weibliche Ratten beschriebn, so konnte hinsichtlich der Kohlenwasserstoffabatmung ein Verschwinden des Sexualdimorphismus festgestellt werden.
Die auch nach Diethyldithiocarbamatgabe fast vollständig verschwundene Ethan- und Ethylenfreisetzung wurde sonst nur bei Ethanol trinkenden weiblichen Wistar Ratten, nicht aber bei unbehandelten oder chronisch Saccharoselösung trinkenden männlichen Ratten beobachtet.
Die durch Diethyldithiocarbamatbehandlung hervorgerufene 1-Buten-Freisetzung lag bei allen Tiergruppen (weiblich Wistar mit chronischer Ethanol- oder Saccharosegabe; männlich Wistar, unbehandelt oder chronisch mit Ethanol- oder Saccharoselösung versorgt) im gleichen Bereich.
Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in den Tabellen 4.3. und 4.4. dargestellt.

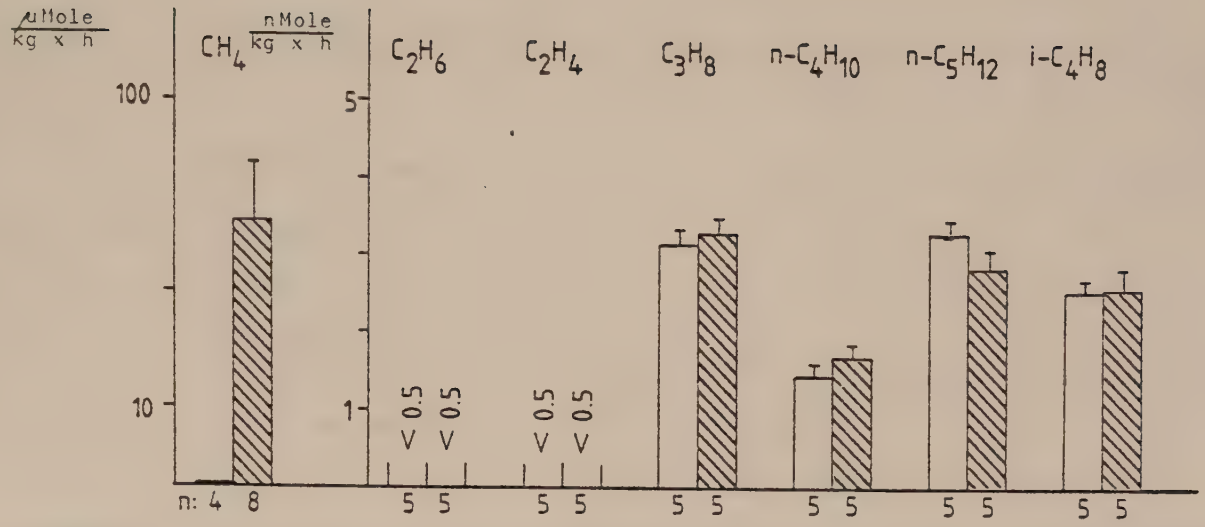


Abbildung 3.25.: Einfluß von Diethyldithiocarbamat (100 mg/kg i.p. 0,5 h vor Beginn der Atemgaskollektion im Exsikkatorsystem) auf die Abatmung gasförmiger Kohlenwasserstoffe bei weiblichen Wistar Ratten nach chronischer Behandlung mit Saccharoselösung (26,9% w/v, offene Säulen) oder Ethanollösung (20%, v/v, schraffierte Säulen) über 12 Wochen. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Tabelle 4.3.: Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch nüchterne männliche Wistar Ratten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), Werte in nMol/kg x h

Tierart (Zahl d. Versuche)	Vorbehandlung	Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan	i-Buten
männlich Wistar (4)	keine	0,75±0,05	1,15±0,22	0,60±0,07	0,51±0,06	0,89±0,20	0,0
männlich Wistar (4)	Diethyldithiocarbamat[a]	1,35±0,24	1,53±0,37	2,60±0,67	0,82±0,06	1,79±0,43	2,85±0,54
männlich Wistar (5)	chron. Saccharose[b]	0,75±0,06	1,22±0,15	0,70±0,14	0,65±0,08	0,78±0,15	0,0
männlich Wistar (5)	chron. Saccharose plus Diethyldithiocarbamat[b,a]	1,30±0,10	1,50±0,21	1,85±0,40	1,01±0,16	2,25±0,55	2,30±0,25
männlich Wistar (7)	chronisch Ethanol[c]	e	e	0,92±0,10	0,85±0,05	0,87±0,12	0,0
männlich Wistar (5)	chronisch Ethanol plus Diethyldithiocarbamat[a,c]	e	e	3,75±0,20	1,10±0,05	2,51±0,65	2,45±0,15

a: 100 mg/kg i.p. 0,5 h vor Meßbeginn; b: 26,9% im Trinkwasser für 12 Wochen; c: 20% im Trinkwasser für 12 Wochen; e: kleiner als 0,5 nMole/kg x h.

Tabelle 4.4.: Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch nüchterne weibliche Wistar Ratten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), Werte in nMol/kg x h

Tierart (Zahl d. Versuche)	Vorbehandlung	Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan	i-Buten
weiblich Wistar (8)	keine	e	e	1,40±0,30	1,15±0,05	2,07±0,05	0,0
weiblich Wistar (5)	chron. Saccharose[b]	e	e	1,25±0,22	1,06±0,07	1,95±0,08	0,0
weiblich Wistar (5)	chron. Saccharose plus[b,a] Diethyldithiocarbamat	e	e	3,15±0,20	1.45±0,13	3,30±0,21	2,25±0,22
weiblich Wistar (5)	chron. Ethanol[c]	e	e	1,25±0,25	1,05±0,05	1,52±0,12	0,0
weiblich Wistar (5)	chron. Ethanol plus Diethyldithiocarbamat[c,a]	e	e	3,30±0,15	1,70±0,20	2,85±0,25	2,55±0,25

a: 100 mg/kg i.p. 0,5 h vor Meßbeginn: b: 26,9% im Trinkwasser für 12 Wochen; c: 20% im Trinkwasser für 12 Wochen; e: kleiner als 0,5 nMole/kg x h.

4.2.9. Behandlungsformen ohne nachfolgend erhöhte Kohlenwasserstoffproduktion

Die orale Applikation von Streptomycin (100 mg/kg) zusammen mit Sulfaguanidin (200 mg/kg) nach Rodkey und Collison (1977) über drei Tage führte zu keiner Veränderung der basalen wie auch der durch akute Ethanolintoxikation (5g/kg p.o. 0,5h vor Meßbeginn) bedingten erhöhten Kohlenwasserstoffabatmung bei nüchternen männlichen Wistar Ratten. Auch die akute Verabreichung des Ethanolmetaboliten Acetaldehyd (100 und 300 mg/kg p.o.) oder des Cytochrom P-450-Hemmers SKF 525 A (100 mg/kg i.p.) 0,5h vor Beginn der Messung führte zu keiner Erhöhung der basalen Kohlenwasserstoffproduktion. SKF 525 A-Behandlung führte darüber hinaus nicht zu einer weiteren Erhöhung der durch akute Ethanolintoxikation hervorgerufenen Kohlenwasserstoffabatmung bei nüchternen männlichen Wistar Ratten.
15 Minuten nach einer Strahlendosis von 600 Rad konnte keine Erhöhung der basalen Kohlenwasserstoffexhalation beobachtet werden. Die durch akute Ethanolgabe induzierte Verstärkung der Kohlenwasserstoffabgabe wurde durch die Strahlenbehandlung ebenfalls nicht beeinflußt.

4.3. Kohlenwasserstofffreisetzung in vitro

Diese Versuche wurden unternommen, um zum einen die Menge der in vivo gefundenen Kohlenwasserstoffe mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation in vitro korrelieren zu können. Zum anderen sollte versucht werden, das Organ zu finden, das als Quelle für die in vivo abgeatmeten Kohlenwasserstoffe in Frage kommt.

4.3.1. Versuche mit der isoliert perfundierten Leber

Die Lebern wurden von über Nacht mit Trinkwasser, aber nicht mit Festfutter versorgten männlichen Wistar Ratten gewonnen.
Das zur Perfusion verwendete Rindererythrozytenmedium wurde auf seine Stabilität überprüft: Allein das Umpumpen in der in Abb. 2.1. beschriebenen Perfusionsanlage für einen Zeitraum von 4 Stunden führte zu maximal 3,5 Prozent Hämolyse. Wurde zusätzlich eine Leber mitperfundiert, so wurde keine stärkere Hämolyserate gefunden.
Wie Tabelle 4.5. zeigt, entwickelte das Perfusionsmedium allein nur geringe Kohlenwasserstoffmengen. In einigen Fällen wurde dagegen eine erhebliche Freisetzung flüchtiger Kohlenwasserstoffe aus den Rindererythrozyten gefunden. In diesen Fällen, in denen die Kohlenstoffproduktion einem Wert von 12 nMol Ethan/kg und 14 nMol Pentan/kg in einer Stunde für das Ganztier entsprochen hätte, wurde das Perfusionsmedium verworfen.

Während der Dauer der Perfusion strömte das Perfusionsmedium an einer pH-Elektrode vorbei, so daß das pH kontinuierlich verfolgt werden konnte. Dabei wurde in der Regel ein pH-Wert von 7,30 - 7,35 registriert. Nur am Anfang lag der Wert bei 7,2, normalisierte sich aber innerhalb der ersten 15 Minuten nach Perfusionsbeginn.

Füllte man zur Überprüfung der Dichtigkeit des Perfusionssystems Perfusionsmedium ein und leitete in den Gasraum ein Gemisch aus 80% Eichgas und 20% Sauerstoff ein, so wurde nach einem initialen Abfall der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase um 5 Prozent während der ersten 20 Minuten (entspricht der Verteilung der Kohlenwasserstoffe zwischen Gasphase und Perfusionsmedium) während der daran anschließenden Beobachtungszeit kein weiterer Abfall der Kohlenwasserstoffkonzentration gefunden.

Die metabolische Kapazität der Leber unter Perfusionsbedingungen wurde folgendermaßen getestet: Hexobarbital (Evipan, Bayer, 25 ug/ml Perfusionsmedium) wurde dem Perfusionsmedium zugesetzt. Nach einer Stunde wurde eine Probe vom Perfusionsmedium abgenommen, mit Trichloressigsäure enteiweißt und nach Realkalisierung mit Kaliumdihydrogenphosphat mit Diisopropyläther extrahiert. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Extraktes nach Breyer-Pfaff (1979) mit Chloroform/Isopropanol (5/1) als Laufmittel in Ammoniakatmosphäre auf Kieselgel mit Cyklobarbital als internem Standard zeigte, daß die Konzentration des Hexobarbitals während einer Stunde auf 5 Prozent der eingesetzten Konzentration abgesunken war. Dafür wurde ein nicht näher charakterisierter, wesentlich polarerer Metabolit beobachtet.

Tabelle 4.5. stellt die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen entwickelten Kohlenwasserstoffmengen dar. Zur leichteren Vergleichbarkeit sind die Werte so angegeben, als wenn sie vom Ganztier produziert worden wären. Dies ist deswegen möglich, weil das Gewicht der Organspender dem der bei den Exhalationsversuchen in vivo verwendeten Versuchstiere entspricht. Weiterhin hat der Gasraum des Perfusionssystems das gleiche Volumen wie der Gasraum des bei den Exhalationsversuchen verwendeten Exsikkators.

Wie bereits oben geschildert, entwickelt sich aus dem Per-

fusionsmedium allein nur eine geringe Menge an Kohlenwasserstoffen.
Wird eine isolierte Rattenleber nur mit Perfusionsmedium perfundiert, so liegt die Zunahme an Kohlenwasserstoffen während einer Stunde im gleichen Bereich, wie bereits bei reinem Perfusionsmedium allein beobachtet. Dabei hat das unterschiedliche Sauerstoffangebot in der Gasphase keinen Einfluß. Der gleiche Befund wurde erhoben, wenn dem Perfusionsmedium steigende Ethanolkonzentrationen zugefügt wurden. Bei Ethanolkonzentrationen von 20, 50 und 100 mM im Medium konnte keine erhöhte Kohlenwasserstoffansammlung in der Gasphase festgestellt werden. Auch hier hatte die unterschiedliche Sauerstoffkonzentration in der Gasphase keinen Einfluß auf die durch Leber und Perfusionsmedium freigesetzte Kohlenwasserstoffmenge.

Wurde Bromtrichlormethan (1 mM im Perfusionsmedium) appliziert, so zeigten Lebern, die 20% Sauerstoff in ihrer Gasphase hatten, eine deutlich erhöhte Produktion von Ethan und n-Pentan. Wurde die gleiche Bromtrichlormethandosis zu Lebern gegeben, die nur eine Sauerstoffkonzentration von 5% in der Gasphase aufwiesen, so wurde die Produktion von Ethan und n-Pentan noch weiter verstärkt. Sie erreichte dabei Werte, die im Bereich derjenigen lagen, die bei der Applikation von der gleichen Bromtrichlormethandosis in vivo beobachtet worden waren. Wie bereits bei den in vivo Versuchen geschildert, konnte auch bei der isoliert perfundierten Leber durch Bromtrichlormethan keine verstärkte Produktion an Ethylen, Propan und n-Butan hervorgerufen werden. Bromtrichlormethanzusatz zum Perfusionsmedium ohne Leber hatte keine erhöhte Kohlenwasserstoffproduktion zur Folge.

Tabelle 4.5.: Entwicklung von Kohlenwasserstoffen im Leberperfusionssystem, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, Angaben in nMol/kg in 1 h

Inhalt des Perfusionssystems	Zahl der Versuche	Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan
Perfusionsmedium ohne Zusatz	4	1,20±0,24	1,15±0,37	0,80±0,15	c	0,92±0,17
Rattenleber ohne Zusatz, 20% O_2 im Gasraum	5	1,05±0,15	1,30±0,22	0,75±0,13	c	1,13±0,16
Rattenleber ohne Zusatz, 5% O_2 im Gasraum	6	1,13±0,17	1,32±0,28	0,92±0,11	c	1,22±0,20
Rattenleber 100 mM Ethanol[b], 5% O_2 im Gasraum	6	1,31±0,25	1,05±0,18	c	c	1,14±0,19
Rattenleber 100 mM Ethanol[b], 20% O_2 im Gasraum	5	1,22±0,20	1,22±0,14	0,95±0,08	c	1,35±0,28
Rattenleber 1 mM BTM[a], 20% O_2 im Gasraum	4	4,31±1,52	1,21±0,23	0,98±0,12	c	5,20±1,43
Rattenleber 1 mM BTM[a], 5% O_2 im Gasraum	4	8,59±2,31	1,28±0,27	0,85±0,09	c	9,23±1,95

a: Bromtrichlormethan, 1 mM im Perfusionsmedium; b: Ethanol, 100 mM im Perfusionsmedium;
c: weniger als 0,5 nMol/kg x h.

Während der Perfusion von Rattenlebern entwickelten sich alle flüchtigen Kohlenwasserstoffe, die bereits in vivo in der Atemluft von Labortieren gefunden worden sind. Lediglich i-Buten konnte bei keiner Versuchsbedingung im Gasraum der Perfusionsapparatur beobachtet werden. Ein Gaschromatogramm einer Gasprobe aus der Perfusionsanlage ist in Abb. 3.26. dargestellt.

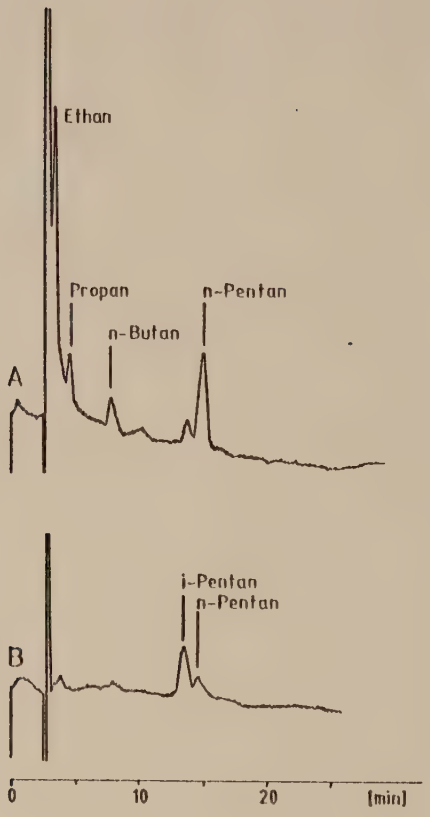


Abbildung 3.26.: Gaschromatische Auftrennung einer Gasprobe aus dem Gasraum der gasdichten Leberperfusionsanlage, die mit der Leber einer männlichen Wistar Ratte beschickt worden ist.
A: 30 Minuten nach Zusatz von Bromtrichlormethan (1 mM im Perfusionsmedium); B: 30 Minuten ohne Zusatz.

4.3.2. Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen

Hochstein und Ernster (1963) berichteten, daß Mikrosomen aus Rattenlebern Thiobarbitursäure-positives Material entwickeln, wenn sie mit ADP und NADPH inkubiert wurden. Sie schlossen daraus, daß Mikrosomen die ADP-aktivierte Peroxidation ihrer Fettsäuren katalysieren, die mit dem NADPH--Oxidasesystem gekoppelt ist. Marks und Hecker (1967) fanden, daß dabei Eisen in Form des Fe^{2+}-Ions notwendig ist. Lumper et al. (1968) fanden keine Hemmung dieses Prozesses durch Kohlenmonoxyd.
Aber auch die Lipidperoxidation durch NADPH allein führt zur Lipidperoxidation (Reiner et al. , 1972). Diese wird von einer Abnahme des Cytochrom P-450-Gehaltes der Mikrosomen begleitet.
Levin et al. (1973) konnten zeigen, daß diese Form der Lipidperoxidation durch Komplexbildner, Schwermetallionen und Radikalfänger verhindert werden kann.

4.3.2.1. Lipidperoxidation mit NADPH

Wurden Rattenlebermikrosomen aus unbehandelten Wistar-Ratten in Headspace-Gläsern mit NADPH inkubiert, so zeigte sich, daß die Entwicklung von Malondialdehyd von einem Anstieg der Ethan- und n-Pentankonzentration im Gasraum begleitet wird. Wurde die Inkubation unter einer Kohlenmonoxyd-Sauerstoffatmosphäre (90% + 10%) durchgeführt, so erhöhte sich die n-Pentan-Freisetzung nach 10 Minuten über die unter Stickstoff-Sauerstoffatmosphäre (80% + 20%) erzielte Rate. Dieser Effekt war nach 30 Minuten noch ausgeprägter (Abb. 3.27.).
Auch die Inkubation von Mikrosomen mit NADPH und 30 mM Ethanol im Ansatz führte zu einer erhöhten n-Pentan-Produktion, während die Malondialdehydbildung und die Ethanfreisetzung, wie schon mit Kohlenmonoxyd beobachtet, von

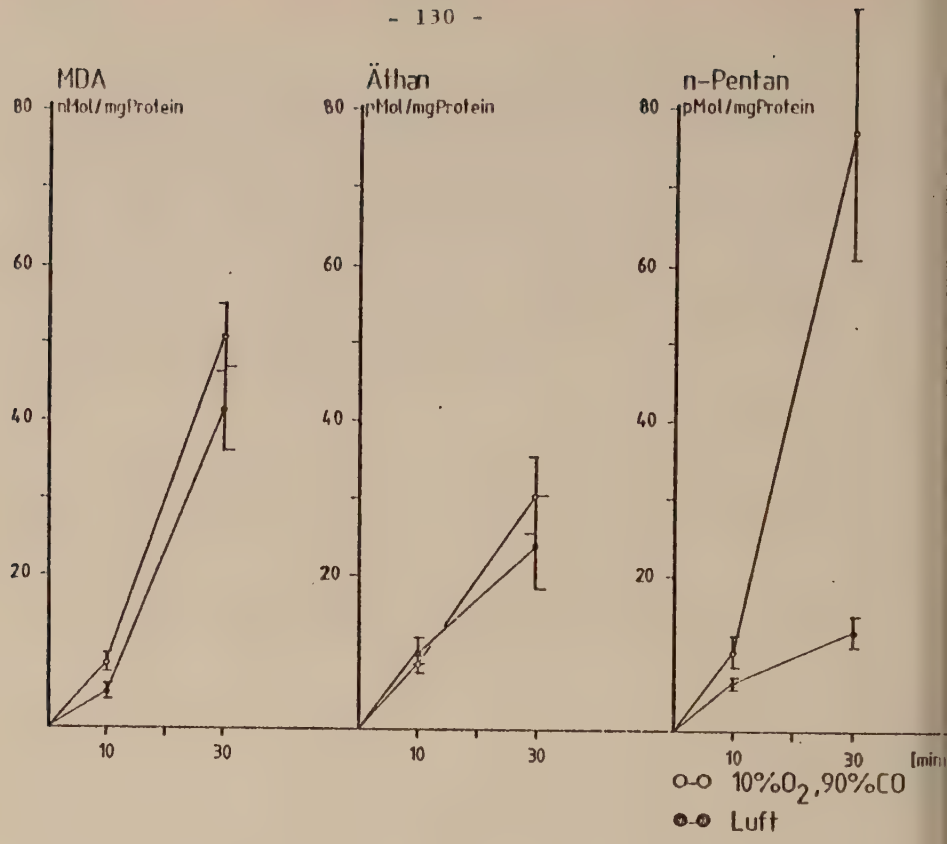


Abbildung 3.27.: NADPH-induzierte Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n=6

dieser Behandlung nicht beeinflußt wurden. Dabei wird die erhöhte n-Pentan-Produktion besonders mit Mikrosomen deutlich, die von unbehandelten Ratten gewonnen worden sind. Mikrosomen aus Tieren, die 14 Wochen lang chronisch Ethanol (20% im Trinkwasser) erhalten hatten (Wachstumskurve Abb. 3.23a), zeigten in dieser Versuchsreihe (Abb. 3.28) geringere, aber nicht signifikant erniedrigte Malondialdehyd-, Ethan- und n-Pentanwerte.

4.3.2.2. Lipidperoxidation mit Fe-ADP

Bei den soeben beschriebenen Versuchen traten große Schwankungen der Meßparameter auf. Da vermutet werden konnte, daß diese Schwankungen auf die unterschiedlichen Fe^{2+}-Ionenkonzentrationen in den einzelnen Inkubationsansätzen zurückzuführen waren, wurde in der Folge die Lipidperoxidation nicht mit NADPH allein, sondern zusätzlich nach Marks und Hecker (1967) mit Fe-ADP ausgelöst.

Die Behandlung von Lebermikrosomen aus unbehandelten Ratten mit NADPH und Fe-ADP führte zu einer Verstärkung der Malondialdehydbildung um den Faktor 10. Gleichzeitig wurden 40 mal mehr Ethan und 100 mal mehr n-Pentan freigesetzt (Abb. 3.29).
Wurden dagegen Mikrosomen aus Ethanolratten peroxidiert, so erhöhte sich die n-Pentan-Freisetzung nur um den Faktor 50.
Wie bereits für die Inkubation mit NADPH allein beschrieben, erhöhte auch in dieser Versuchsanordnung der Zusatz von 30 mM Ethanol zum Inkubationsmedium die n-Pentan-Freisetzung zusätzlich, während die Malondialdehyd- und Ethanproduktion davon nicht betroffen wurde. Mikrosomen aus Ethanoltieren setzen auch unter Ethanolzusatz zum Inkubationsmedium weniger n-Pentan frei als Mikrosomen aus Kontrolltieren.

Inkubation der Mikrosomen nach Slater (1972) mit dem Hemmstoff SKF 525 A (10^{-4} mM) führte zu einem Rückgang der Malondialdehydproduktion auf die Werte, die bei der Inkubation der Mikrosomen ohne Zusätze beobachtet werden können. Gleichzeitig sanken trotz der Gegenwart von Fe-ADP und NADPH die Ethan- und n-Pentanspiegel ab. Die Inkubation von Mikrosomen unter Zusatz von EDTA führte zu einer vollständigen Hemmung der Lipidperoxidation durch NADPH/Fe-ADP.

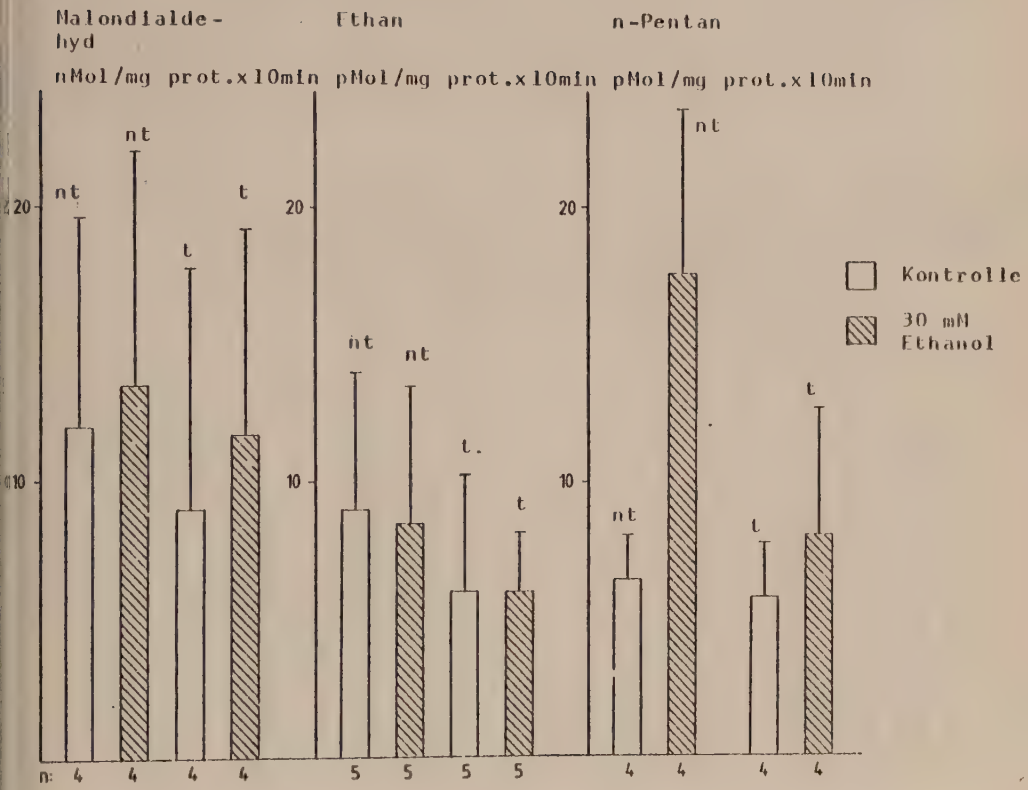


Abbildung 3.28.: NADPH-induzierte Lipidperoxidation in Mikrosomen von männlichen Wistar Ratten ohne Vorbehandlung (nt) und nach Applikation von Ethanollösung als Trinkflüssigkeit (20%, v/v, 14 Wochen), (t). $\bar{x} \pm s$

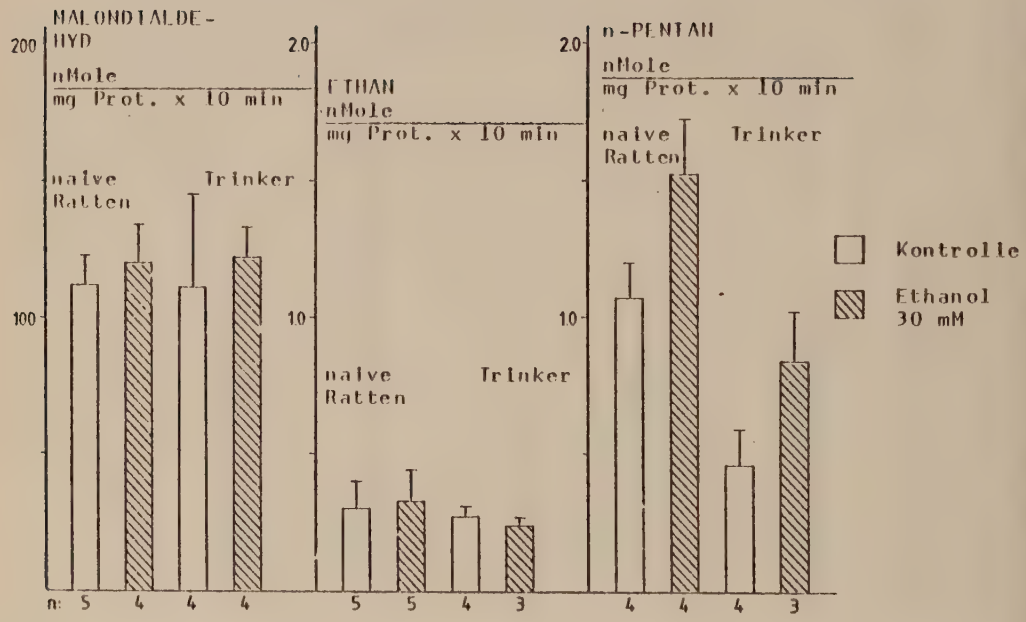


Abbildung 3.29.: Induktion von Lipidperoxidation in Lebermikrosomen von unbehandelten Ratten und Tieren, die chronisch Ethanol (20% v/v) im Trinkwasser erhalten hatten, durch ADP-Eisenionen. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

4.4. Elimination von Kohlenwasserstoffen aus einem geschlossenen Expositionssystem durch Labortiere in vivo

Die Untersuchung des Zeitverlaufs der Kohlenwasserstoffabatmung durch Labortiere hatte gezeigt, daß die Abatmung nicht über einen längeren Zeitraum konstant ist, sondern daß die Konzentration im Gasraum des Exsikkators einem Gleichgewicht zustrebt.
Dies ließ den Schluß zu, daß in diesem Falle die Exhalation der Kohlenwasserstoffe durch Reinhalation und intrakorporalen Metabolismus überlagert wird. Frommer et al. (1970) hatten bereits zeigen können, daß Kohlenwasserstoffe ein Substrat für mikrosomale Enzyme darstellen und von diesen zu Alkoholen umgesetzt werden.

Um zu prüfen, ob Kohlenwasserstoffe auch in vivo metabolisiert werden können, wurden Labortiere in einem geschlossenen Expositionssystem mit einer Atmosphäre, die den jeweiligen Kohlenwasserstoff enthielt, exponiert. Dabei wurde in Übereinstimmung mit Frommer et al. (1970) gefunden, daß der Abfall der Konzentration des Kohlenwasserstoffs im Expositionssystem mit zunehmendem Molekulargewicht der Alkane zunimmt (Abb. 3.30). Isobuten zeigte den schnellsten Abfall.
Dabei konnte, wie bereits im Abschnitt über die pharmakokinetische Analyse beschrieben, jeweils ein schneller, in der halblogarithmischen Darstellung nichtlinearer Abfall während der ersten 20 Minuten und ein darauf folgender linearer Kurvenbereich beobachtet werden. Der nichtlineare Bereich stellt die Verteilungsphase zwischen Gasraum und Tier dar, während der daran anschließende, lineare Bereich die Clearance des Systems durch Metabolisierung des Kohlenwasserstoffs zu den entsprechenden Alkoholen ausdrückt. Die pharmakokinetischen Daten, die von diesen Inhalationsexperimenten gewonnen wurden, werden in den nachfolgenden Tabellen erläutert und zusammengefaßt.

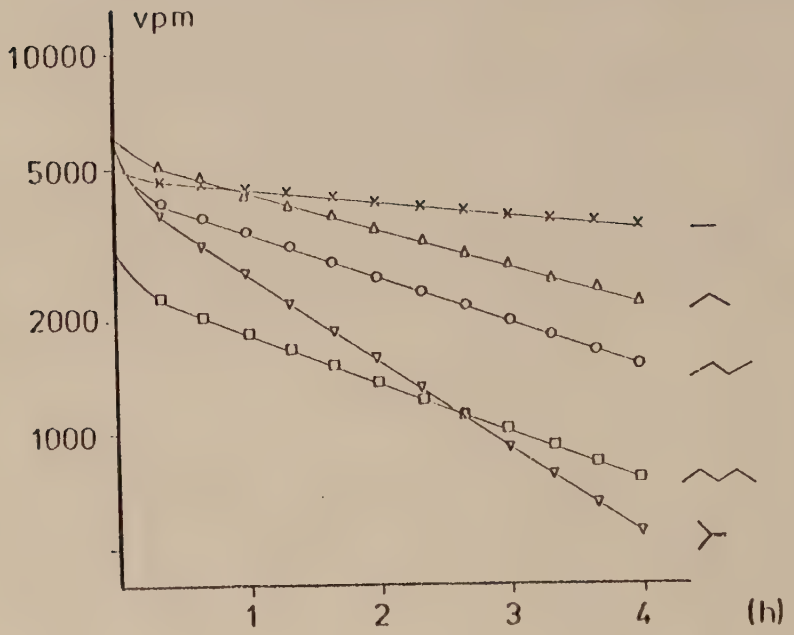


Abbildung 3.30.: Elimination flüchtiger Kohlenwasserstoffe aus dem Gasraum eines statischen Expositionssystems durch zwei männliche SIV Ratten

4.4.1. Ethan-Elimination

Ethan ist bei Raumtemperatur ein geruchloses, farbloses und brennbares Gas. Bei -88°C wird es flüssig, bei -172°C fest.
Werden Labortiere einer Ethanatmosphäre in einem geschlossenen Expositionssystem ausgesetzt, so erhält man die in Tabelle 4.6. dargestellten kinetischen Größen: Mäuse eliminieren schneller als Wistar Ratten und diese wiederum schneller als SIV Ratten (letztere sind eine Unterrasse des Sprague Dawley Stammes). Phenobarbital-Inkubation führte bei Mäusen zu einer leichten Beschleunigung der Elimination. Bei Ratten zeigte diese Substanz keinen Effekt. Eine Hemmung der Ethanaufnahme konnte durch Ethanol- und Diethyldithiocarbamatgabe erzielt werden.

4.2.2. Propan-Elimination

Propan ist ein farb- und geruchloses, brennbares Gas bei Raumtemperatur. Bei -44,5°C wird es flüssig, bei -189,9°C fest.
Die in Tabelle 4.7. dargestellten kinetischen Parameter wurden durch Exposition von SIV Ratten mit einer Propanatmosphäre in einem geschlossenen Exsikkatorsystem gewonnen.
Phenobarbital-Induktion, aber nicht die Vorbehandlung mit Methylcholanthren, beschleunigte die Propaneliminination.
Akute Ethanolintoxikation führte zu einer dramatischen Hemmung der Propanaufnahme.

Tabelle 4.6.: Kinetische Parameter für die Elimination von Ethan aus einem geschlossenen Expositionssystem durch Labortiere[a] in vivo[c]

Tierart	$t_{0,5}$ (h)	k' (h^{-1})	Clearance (l/kg x h)	K_{eq}	n
Wistar Ratten, männl.	8,50 8,50	0,08 0,08	0,42 0,42	1,0 1,0	2
Wistar Ratten, männl. akute Ethanolgabe[b]	14,00 14,00	0,05 0,05	0,26 0,26	1,0 1,0	2
SIV Ratten männlich	9,33	0,07	0,50±0,00	1,0	3
SIV Ratten männlich, Phenobarbital-Induz.[e]	9,33	0,07	0,50±0,00	1,0	3
SIV Ratten männlich akute Dithiocarbgabe[d]	13,5	0,05	0,29±0,05	1,0	3
NMRI Mäuse männlich	6,15	0,112	1,56±0,03	1,0	4
NMRI Mäuse männlich Phenobarbital-Induz.[b]	5,82	0,119	1,65±0,04	1,0	3

a: Ratten erhielten vor dem Versuch 24 h, Mäuse 14 h lang Trinkwasser, aber kein Festfutter. Das System enthielt je zwei Ratten oder 5 Mäuse

b: 5 g Ethanol/kg p.o. 0,5 h vor Exposition mit Ethan

c: 80 mg/kg i.p., dann drei Tage lang in 0,1%iger Lösung

d: Diethyldithiocarbamat, 100 mg/kg i.p., 1 h vor Ethanexposition

e: Angaben entweder als Ergebnisse der Einzelversuche oder als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

Tabelle 4.7.: Kinetische Parameter für die Elimination von Propan aus einem geschlossenen Expositionssystem durch Labortiere[a] in vivo[b].

Tierart	$t_{0,5}$ (h)	k' (h^{-1})	Clearance (l/kg x h)	k_{eq}	n
SIV Ratten männlich	2,95	0,23	1,39±0,03	0,9	3
SIV Ratten männlich Phenobarbital-induz.[c]	2,50	0,28	1,57±0,05	0,9	5
SIV Ratten männlich Methylcholantren-behandelt[d]	2,60	0,26	1,41±0,04	0,9	4
SIV Ratten männlich akute Ethanolgabe[e]	10,00	0,07	0,42±0,06	0,9	3

a: Die Ratten erhielten vor dem Versuch 24 h lang Trinkwasser, aber kein Festfutter. Der Exsikkator enthielt je 2 Tiere.

b: Angaben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

c: 80 mg/kg i.p., dann drei Tage lang als 0,1%ige Lösung im Trinkwasser.

d: 40 mg/kg i.p. 3 Tage vor dem Versuch.

e: 5g/kg p.o. 0,5 h vor der Exposition mit Propan.

4.4.3. n-Butan-Elimination

n-Butan ist bei Zimmertemperatur ein farbloses, brennbares Gas. Bei -0,5°C wird es flüssig, bei -138,4°C wird es fest.
Die kinetischen Parameter der Elimination von n-Butan aus der Atmosphäre eines geschlossenen Expositionssystems durch Labortiere sind in Tabelle 4.8. zusammengefaßt: SIV-Ratten metabolisieren n-Butan besser als Meerschweinchen. Phenobarbital-Behandlung beschleunigt, Ethanolintoxikation hemmt die Aufnahme dieses Kohlenwasserstoffes.

4.4.4. n-Pentan-Elimination

n-Pentan ist bei Raumtemperatur eine Flüssigkeit mit hohem Dampfdruck (Siedepunkt: 36,1°C). Bei -129,7°C wird es fest.
Werden Labortiere in einem geschlossenen Expositionssystem einer n-Pentan-Atmosphäre ausgesetzt, so kann die in Abb. 2.3. gezeigte Eliminationskurve beobachtet werden. Die aus den Expositionsversuchen mit n-Pentan gewonnenen kinetischen Daten zeigen die Tabellen 4.9 und 4.10. Mäuse haben eine größere n-Pentan-Clearance als Wistar Ratten. Letztere metabolisieren n-Pentan schneller als SIV-Ratten. Vorbehandlung mit Phenobarbital beschleunigt die Elimination von n-Pentan bei Mäusen und SIV-Ratten, nicht aber bei Wistar Ratten. Bei SIV-Ratten konnte die Elimination auch durch Vorbehandlung mit Methylcholanthren beschleunigt werden, während chronische Ethanolapplikation keinen Effekt zeigte. Gehemmt wurde die n-Pentan-Aufnahme bei Ratten durch akute Applikation von Ethanol, Diethyldithiocarbamat, Tetrahydrofuran und Propandiol-1,2.
SKF 525 A- und Benzoflavongabe hatten keinen Einfluß auf die Clearance dieses Kohlenwasserstoffes.

Tabelle 4.8.: Kinetische Parameter für die Elimination von n-Butan aus einem geschlossenen Expositionssystem durch Labortiere[a] in vivo[b].

Tierart	$t_{0,5}$ (h)	k' (h^{-1})	Clearance (l/kg x h)	K_{eq}	n
SIV Ratten männlich	2,60	0,27	1,53±0,06	1,1	3
SIV Ratten männlich Phenobarbital-induz.[c]	2,20	0,31	1,81±0,05	1,1	4
SIV Ratten, männlich akute Ethanolgabe[d]	8,25	0,09	0,41± 0,01	1,1	5
Meerschwein männlich	5,5	0,13	0,79±0,02	1,1	3
Meerschwein männlich akute Ethanolgabe[d]	10,0	0,07	0,42±0,02	1,1	3

a: Die Tiere erhielten vor dem Versuch 24 h lang Trinkwasser, aber kein Festfutter. Der Exsikkator enthielt je zwei Tiere

b: Angaben in $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

c: 80 mg/kg i.p., dann drei Tage lang als 0,1%ige Lösung im Trinkwasser

d: 5 g/kg p.o. 0,5 h vor der Exposition mit n-Butan

Tabelle 4.9.: Kinetische Parameter für die Elimination von n-Pentan aus einem geschlossenen Expositionssystem durch Labortiere[a] in vivo[b]

Tierart	$t_{0,5}$ (h)	k' (h^{-1})	Clearance (l/kg x h)	K_{eq}	n
Wistar Ratten, männl.	0,83 0,83	0,83 0,83	5,64 5,64	3,0 3,0	2
Wistar Ratten, männl. Phenobarbital-induz.[c]	0,83	0,83	5,64	3,0	1
Wistar Ratten, männl. akute Ethanolgabe[d]	6,67	0,10	0,75	3.0	1
Wistar Ratten, männl. SKF 525 A--Gabe[e]	0,75	0,92	6,35	3.0	1
Wistar Ratten, männl. Dithiocarb, akut[f]	6,00	0,11	0,76	3,0	1
NMRI Mäuse männlich	0,79 0,79	0,88 0,88	12,85 12,85	3,0 3,0	2
NMRI Mäuse männlich	0,97	0,70	10,07	3,0	2
Phenobarbital-induz.[e]	0,97	0,70	10,07	3,0	

a: Ratten erhielten vor dem Versuch 24 h lang, Mäuse 14 h lang Trinkwasser, aber kein Festfutter

b: Angaben als Resultate der Einzelversuche
Der Exsikkator enthielt entweder 2 Ratten oder 5 Mäuse

c: 80 mg/kg i.p., dann drei Tage lang als 0,1%ige Lösung im Trinkwasser

d: 5 g/kg p.o. 0,5 h vor der Exposition mit n-Pentan

e: 100 mg/kg i.p. 1 h vor der Exposition mit n-Pentan

f: Diethyldithiocarbamat, 100 mg/kg i.p. 1 h vor der Exposition mit n-Pentan

Tabelle 4.10.: Kinetische Parameter für die Elimination von n-Pentan aus einem geschlossenen Expositionssystem durch männliche SIV Ratten[a] in vivo[b]

Vorbehandlung	$t_{0,5}$ (h)	k' (h^{-1})	Clearance (l/kg x h)	K_{eq}	n
keine	2,30	0,30	2,30±0,28	3,0	4
Phenobarbital-induziert[c]	1,13	0,61	4,69±0,25	3,0	3
chron. Ethanol	2,30	0,30	2,31±0,30	3,0	3
Methylcholanthren-induz.[d]	1,77	0,39	3,00±0,15	3,0	3
akute Ethanolgabe[e]	6,40	0,11	0,80±0,00	3,0	3
Tetrahydrofuran akut[f]	6,40	0,11	0,80±0,00	3,0	3
Dithiocarbamat akut[f]	6,40	0,11	0,80±0,00	3,0	3
SKF 525 A, akut[f]	2,30	0,30	2,30±0,08	3,0	3
Benzoflavon, akut[f]	2,35	0,29	2,39	3,0	1
Propandiol 1-1,2; akut[g]	5,4	1,13	0,93	3,0	1

a: Die Tiere erhielten vor dem Versuch 24 h lang Trinkwasser, aber kein Festfutter. Der Exsikkator enthielt je 2 Ratten

b: Angaben entweder als Resultat der Einzelexperimente oder als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

c: 80 mg/kg i.p., dann drei Tage lang als 0,1%ige Lösung im Trinkwasser

d: 40 mg/kg i.p. drei Tage vor Versuchsbeginn

e: 5 g/kg p.o. 0,5 h vor der Exposition mit n-Pentan

f: 100 mg/kg i.p. 1 h vor der Exposition mit n-Pentan

g: 1 g/kg i.p. 1 h vor der Exposition mit n-Pentan

4.4.5. i-Buten-Elimination

i-Buten ist bei Raumtemperatur ein unangenehm riechendes, farbloses und feuergefährliches Gas. Bei 6,3°C wird es flüssig, bei -185,3°C wird es fest.
Die bei den Expositionsversuchen mit i-Buten gewonnenen kinetischen Größen sind in Tabelle 4.11. zusammengefaßt: Danach metabolisieren SIV-Ratten i-Buten schneller als Meerschweinchen. Die Aufnahme dieses Kohlenwasserstoffes wird bei beiden Tieren durch akute Ethanolgabe gehemmt. Bei SIV-Ratten konnte zusätzlich die Hemmung durch Tetrahydrofuran gezeigt werden.
Phenobarbitalvorbehandlung führte bei SIV-Ratten zu einer beschleunigten Elimination von i-Buten aus dem Gasraum des Exsikkatorsystems.

4.4.6. Elimination eines Kohlenwasserstoffgemisches

Bei den soeben geschilderten Versuchen wurden Anfangskonzentrationen der Kohlenwasserstoffe von 3000 bis 6000 ppm eingesetzt.
Bei einer weiteren Versuchsreihe wurden männliche Wistar Ratten, wie im Methodenteil beschrieben, einer Eichgas-Sauerstoff-Atmosphäre ausgesetzt. Dabei wurden initiale Konzentrationen im Bereich von 70 bis 150 ppb erzielt. Auch bei diesen Versuchen ergaben die Eliminationskurven die gleiche Charakteristik wie oben beschrieben: Nach einer Verteilungsphase am Anfang konnte eine im halblogarithmischen Auftrag lineare Metabolisierungsphase beobachtet werden. Dabei konnten die kinetischen Daten für die Elimination von Ethan, Propan, n-Butan, n-Pentan und i-Buten bestätigt werden.
Zusätzlich wurde auch die metabolische Elimination von Ethylen, i-Butan und i-Pentan beobachtet. Akute Ethanolintoxikation sowie die Applikation von Diethyldithiocarbamat führte bei allen Kohlenwasserstoffen zur Hemmung ihrer Aufnahme.

Tabelle 4.11.: Kinetische Parameter für die Elimination von 1-Buten aus einem geschlossenen Expositionssystem durch Labortiere[a] in vivo[b]

Tierart	$t_{0,5}$ (h)	k' (h^{-1})	Clearance (l/kg x h)	K_{eq}	n
SIV Ratten männlich	1,35	0,51	2,82±0,02	0,7	3
SIV Ratten männlich Phenobarbital-induz.[c]	1,25	0,55	3,05±0,03	0,7	3
SIV Ratten männlich	5,75	0,12	0,43	0,7	2
akute Ethanolgabe[d]	5,83	0,12	0,43	0,7	
SIV Ratten männlich Tetrahydrofuran, akute[e]	4,75	0,15	0,56	0,7	1
Meerschwein männlich	2,90	0,23	1,13±0,05	0,7	3
Meerschwein männlich akute Ethanolgabe[f]	5,80	0,12	0,55±0,07	0,7	3

a: Die Tiere erhielten vor dem Versuch 24 h lang Trinkwasser, aber kein Festfutter. Der Exsikkator enthielt je zwei Tiere

b: Angaben entweder als Resultate der einzelnen Versuche oder als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

c: 80 mg/kg i.p., danach drei Tage lang als 0,1%ige Lösung im Trinkwasser

d: 5 g/kg p.o. 0,5 h vor der Exposition mit 1-Buten

e: 100 mg/kg i.p. 1 h vor der Exposition mit 1-Buten

f: 5 g/kg i.p. 0,5 h vor der Exposition mit 1-Buten

4.5. Methanabatmung in vivo

Bereits im Abschnitt über die Kohlenwasserstofffreisetzung durch Ratten nach chronischer Ethanolvorbehandlung wurde auf den Befund hingewiesen, daß diese Tiere beträchtliche Mengen an Methan an den Gasraum des Exsikkators abgaben. Diese Mengen waren um 4 Zehnerpotenzen größer als die der übrigen Kohlenwasserstoffe, die daneben als Marker für Lipidperoxidation analysiert worden waren.
Massive Methanfreisetzung konnte auch bei Wistar Ratten beobachtet werden, die zwei Wochen vor der Analyse ihrer Atemgase mit 600 Rad bestrahlt worden waren. In diesem Falle mußte allerdings wegen unzulänglicher Analytik auf die exakte Quantifizierung der Methanproduktion verzichtet werden.

Eine Überprüfung von Labortieren verschiedener Spezies ergab, daß unbehandelte Ratten und Mäuse nur geringe Mengen an Methan freisetzen. Erhöhte Methanproduktion wurde nur bei Meerschweinchen gefunden (Tabelle 4.12.). Wurde diesen Meerschweinchen ein Polyethylenbeutel, der vorher mit kohlenwasserstofffreier synthetischer Luft gefüllt worden war, entweder über den Kopf oder das Hinterteil gestülpt und mit Hilfe eines Gummibandes hinter den Vorderbeinen (für die Kollektion der oralen Gasproduktion) oder vor den Hinterbeinen (für die Messung der analen Produktion) befestigt, so konnte geprüft werden, woher das in den Exsikkatoren gefundene Methan stammte. Direkt nach der Befestigung des Polyethylenbeutels wurde die Methankonzentration in seinem Inneren bestimmt. Eine weitere Methanmessung erfolgte nach 5 Minuten. Wie Abb. 3.31. zeigt, ergab sich dabei, daß die Meerschweinchen Methan hauptsächlich über die Atemluft abgeben. Die Tatsache, daß Methan aber auch zusammen mit Faeces abgegeben wurde, ließ darauf schließen, daß die Methanproduktion selbst im Darm der Tiere vor sich geht. Da das Luftvolumen im Beutel durch unterschiedlich weites Hineinragen der Tiere und Verformung während der

Tabelle 4.12.: Methanfreisetzung bei Labortieren (Zahl der Versuche in Klammern, Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Tierart	Methanabatmung (µMol/kg x h)
Wistar Ratte, männlich (10) nüchtern[a]	0,025 ± 0,003
Wistar Ratte, weiblich (6) chron. Saccharose[b], nüchtern	0,044 ± 0,005
NMRI-Mäuse (4)[c]	0,130 ± 0,030
Meerschwein, männlich (11) gefüttert	835 ±86,5
Wistar Ratte, männlich (8) chronisch Ethanol[d], über Nacht nüchtern und Wasser als Getränk	56,70 ±10,60
Wistar Ratte, weiblich (8) chronisch Ethanol[d], über Nacht nüchtern und Wasser als Getränk	69,5 ±15,40

a: 24 h ohne Futter, aber mit Trinkwasser ad libitum

b: 3 Monate lang 26,9% Saccharose im Trinkwasser

c: Je 4 Mäuse im Exsikkator

d: 3 Monate lang 20% Ethanol und 0,25% Saccharin im Trinkwasser

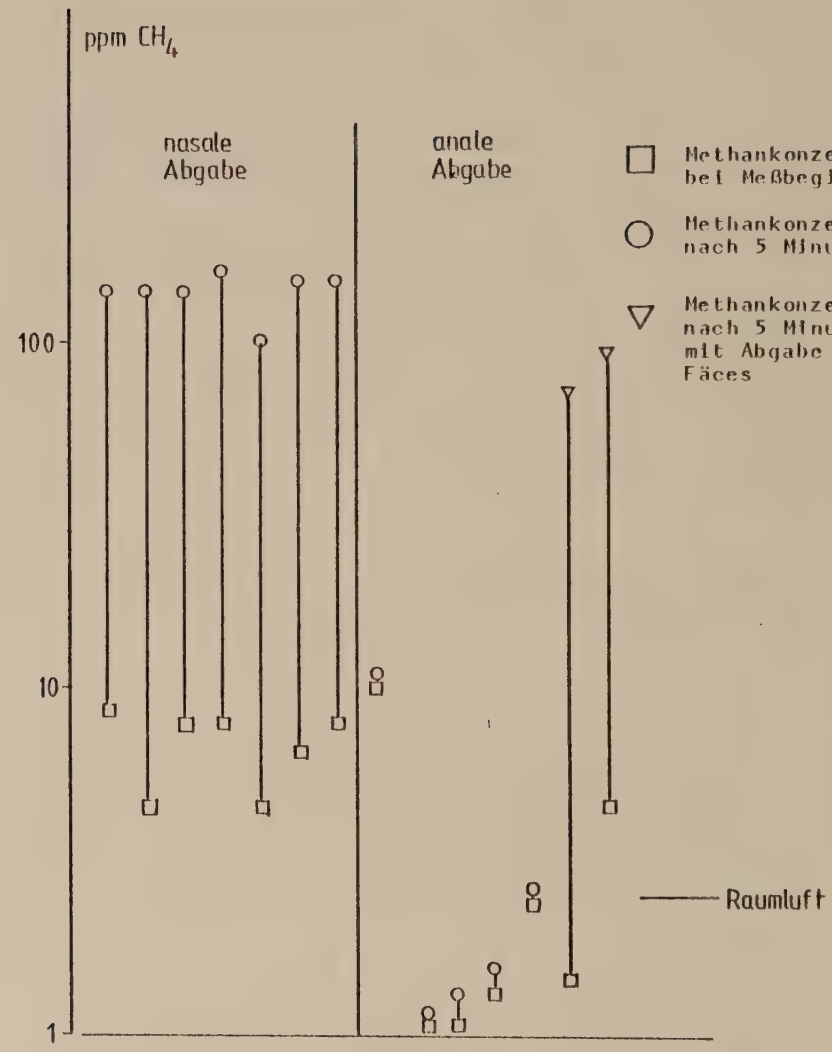


Abbildung 3.31.: Nasale und anale Methanabgabe durch männliche Meerschweinchen. Bestimmung des Anstiegs der Methankonzentration in Polyethylenbeuteln, die für 5 Minuten über dem Vorder- oder Hinterteil der Tiere befestigt worden waren.

Manipulation nicht genau bestimmt werden konnte, sind die Ergebnisse dieses Versuches als Konzentrationsanstieg angegeben.

4.5.1. Beeinflussung der Methanproduktion

Es wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, die zur Klärung der Ursache der Methanproduktion beitragen sollten. Methanabatmung wurde bereits früher beim Menschen (Bond et al., 1971), Labortieren (Rodkey et al., 1972) und Wiederkäuern (Neill et al., 1978) beschrieben. In den hier beobachteten Fällen war aber nicht ohne weiteres davon auszugehen, daß, wie von den oben zitierten Autoren beschrieben, die Methanproduktion von Mikroorganismen der Darmflora stammte.
Auch war nicht bekannt, welches Substrat zu Methan umgewandelt wird. Neill et al. (1978) hatten gezeigt, daß Cholin von Mikroorganismen in Wiederkäuern zuerst zu Trimethylamin und dann weiter zu Methan verstoffwechselt wird. Huerga und Popper hatten bereits 1952 beschrieben, daß die intestinale Flora des Menschen Cholin zu Trimethylamin umsetzen kann.

4.5.1.1. Hemmstoffe von Cytochrom P-450

Den Einfluß von SKF 525 A auf die Methanabgabe von chronisch Ethanol trinkenden Ratten sowie den Einfluß von Metyrapon auf die Methanproduktion von chronisch Ethanol trinkenden Ratten und unbehandelten Meerschweinchen zeigt Tabelle 4.13.. Beide Substanzen hemmen die Methanabatmung. Prozentual ist zwar der Hemmeffekt von Metyrapon bei Meerschweinchen nur gering, der Rückgang der Methanproduktion ist aber um eine Zehnerpotenz größer als bei Ratten.

Tabelle 4.13.: Einfluß von SKF 525 A und Metyrapon auf die Methanabgabe
(Zahl der Versuche in Klammern, Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Tierart und Behandlung	Methanfreisetzung (µMol/kg x h)	Hemmung %
weiblich Wistar, über Nacht nüchtern[a] (5)	65,20 ± 15,00	
SKF 525[b] (5)	22,32 ± 3,00	61,0 ± 6,4
weiblich Wistar, über Nacht nüchtern[a] (4)	40,00 ± 6,83	
Metyrapon[c] (4)	21,40 ± 3,84	54,7 ± 8,3
Männlich Meerschwein nicht nüchtern (4)	945,5 ±87,6	
Metyrapon[c] (4)	783,5 ±56,13	19,8 ± 1,3

a: chronisch Ethanol (20% im Trinkwasser) für 5 Monate, über Nacht Wasser als Getränk

b: 100 mg/kg i.p. 1 h vor Meßbeginn und 3 h nach Messung des Basiswertes

c: 100 mg/kg i.p. 1 h vor Meßbeginn und 3 h nach Messung des Basiswertes

4.5.1.2. Einfluß der Fütterung

Tabelle 4.14. zeigt die Abnahme der Methanabatmung durch Futterentzug. Fasten über Nacht reduziert die Methanproduktion um 76 Prozent.
Weiteres Fasten um weitere 24 Stunden verringert diesen Wert nochmals um 60 Prozent. In einem ähnlichen Experiment wurde den Tieren statt Wasser während der Hungerperiode weiterhin Ethanol als Getränk angeboten.
Dadurch wurde aber der durch das Hungern bedingte Rückgang der Methanabatmung nicht beeinflußt.

4.5.1.3. Antibiotikabehandlung

Antibiotikabehandlung durch orale Applikation von Neomycin und Sulfaguanidin (Resulfon S) führt zu einem deutlichen, aber nicht vollständigen Rückgang der Methanproduktion. Tabelle 4.15 macht das deutlich.

4.5.1.4. Absetzen der chronischen Ethanolbehandlung

Auf der Tabelle 4.16 wird dargestellt, daß die Methanproduktion der chronisch Ethanol trinkenden Ratten nachläßt, wenn diese Behandlung nicht weiter fortgesetzt wird. Es kommt aber selbst nach 3 Monaten nicht zu einem vollständigen Verschwinden der Methanabatmung.

4.5.1.5. Infektion

Bond et al. (1971) konnten zeigen, daß Ratten dann zu Methanbildnern wurden, wenn sie mit Fäces von methanbildenden Ratten kontaminiert worden waren. Dazu wurde täglich

Tabelle 4.14.: Einfluß der Fütterung auf die Methanabatmung von weiblichen Wistar Ratten ($n=4$, Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)[a]

Behandlung	Methanfreisetzung (µMol/kg x h)
gefüttert, Ethanol als Getränk	191,8 ± 67,0
24 h nüchtern, Wasser als Getränk	44,5 ± 9,0
48 h nüchtern, Wasser als Getränk	17,9 ± 4,7
erneut 24 h gefüttert, Wasser als Getränk	209 ± 98,6

a: chronisch Ethanol (20%) und Saccharin (0,25%) seit 6 Monaten im Trinkwasser.

Tabelle 4.15.: Einfluß der Antibiotikabehandlung auf die Methanabatmung von weiblichen Wistar Ratten ($n=4$, Werte als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)[a]

Behandlung	Methanfreisetzung (µMol/kg x h)
gefüttert und über Nacht Trinkwasser	60,30 ± 12,80
gefüttert, 5 Tage ohne Ethanol und 3 Tage unter Antibiotika[b]	9,22 ± 3,51

a: Die Tiere wurden 5 Monate lang chronisch mit 20% Ethanol und 0,25% Saccharin im Trinkwasser versorgt.

b: 100 mg/kg Neomycin und 100 mg/kg Sulfaguanidin p.o. 1x täglich für drei Tage, Methanmessung erfolgte direkt vor der ersten und 24 h nach der letzten Antibiotikagabe.

Tabelle 4.16.: Entwicklung der Methanabatmung nach Absetzen von der chronischen Ethanolbehandlung bei weiblichen Wistar Ratten
$(\bar{x} \pm s_{\bar{x}})^a$

Tierbehandlung	Methanfreisetzung (µMol/kg x h)
gefüttert über Nacht und Ethanol als Getränk	126,5 ± 24,2
über Nacht gefüttert und Wasser als Getränk	121,8 ± 29,2
über Nacht gefüttert und 8 Tage ohne Ethanol	55,4 ± 11,7
über Nacht gefüttert und 15 Tage ohne Ethanol	27,9 ± 4,40
über Nacht gefüttert und 12 Wochen ohne Ethanol	5,09 ± 0,87

a: Die Tiere hatten vor dem Absetzen der Ethanolbehandlung 6 Monate lang 20% Ethanol und 0,25% Saccharin im Trinkwasser erhalten.

die Einstreu aus einem Käfig mit Methan produzierenden Ratten in den Käfig der zu infizierenden Ratten gegeben. Auch in den vorliegenden Versuchen wurde diese Methode verwendet. Wie Tabelle 4.17. zeigt, konnte auf diese Weise auch bei normalen, nicht mit Ethanol behandelten Ratten nach ein bis zwei Wochen eine gesteigerte Methanabatmung erzeugt werden. Dies kann, wenn auch verringert, noch 3 Monate nach Beendigung der Kontamination mit Fäces von Methanabatmern nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob sich auch durch Kontamination mit Fäces von Meerschweinchen die Methanproduktion von Ratten steigern läßt. Da Ratten die Fäces von Meerschweinchen nicht freiwillig in ausreichender Menge aufnehmen, wurde in diesen Versuchen der Meerschweinchenkot als wässrige Suspension mit der Schlundsonde appliziert. Wie Tabelle 4.18. zeigt, konnte mit dieser Behandlung nur dann eine Erhöhung der Methanabatmung erzielt werden, wenn die Ratten zusätzlich zur Kotabgabe chronisch Ethanol im Trinkwasser erhielten.

4.5.2. Methanabatmung beim Menschen

Um zu demonstrieren, daß das für die bisher beschriebenen Tierversuche entwickelte Verfahren auch für die Bestimmung der Methankonzentration in der Atemluft des Menschen anwendbar ist, wurden gesunde Freiwillige untersucht. Die Probanden atmeten über ein Mundstück direkt in das Gassammelventil des Gaschromatographen. Nur die Ausatemluft am Schluß der Expiration wurde analysiert. Abb. 332 illustriert die Verteilung der Methankonzentrationen, die morgens von nüchternen Versuchspersonen erhalten wurden.

Tabelle 4.17.: Beeinflussung der Methanabatmung von zuvor unbehandelten männlichen Wistar Ratten durch Kontamination mit Einstreu aus Käfigen mit Methan produzierenden weiblichen Wistar Ratten
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n=4)

Tierbehandlung	Methanproduktion (μMol/kg x h)
über Nacht gefüttert, keine Vorbehandlung[a]	0,100 ± 0,016
8 Tage nach Beginn der Kontamination, über Nacht gefüttert	11,71 ±11,56
14 Tage nach Beginn der Kontamination, über Nacht gefüttert[b]	25,18 ± 6,87
11 Wochen nach Beendigung der Kontamination, über Nacht gefüttert	5,30 ± 0,85

a: Nach Messung dieses Ausgangswertes erhielten die Ratten täglich die Einstreu aus Käfigen, die mit Methan produzierenden weiblichen Wistar Ratten besetzt waren.

b: Nach der Messung dieses Wertes wurden die Tiere nicht mehr weiter mit Einstreu aus Käfigen mit Methan produzierenden Ratten versorgt.

Tabelle 4.18.: Einfluß der Applikation von Meerschweinchenkotsuspension auf die Methanabatmung von männlichen SIV Ratten
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n=4)[a], Werte als µMol/kg x h

Tierbehandlung	Naive Tiere	Ethanoltrinker[d]
Methanabatmung vor der 1. Kotapplikation, über Nacht gefüttert	0,216 ± 0,016	0,399 ± 0,053
7 Tage nach Beginn der Kotapplikation, über Nacht gefüttert[b]	0,084 ± 0,027	82,5 ± 47,21
3 Tage nach Absetzen der Kotapplikation, über Nacht gefüttert, 3 Tage lang Sulfaguanidin[c]	-	161,0 ± 64,9

a: Die Meerschweinchen, von denen der Kot gewonnen wurde, gaben gefüttert 708,5 ± 117,5 µMol Methan pro kg und Stunde ab. Die Kotsuspension (1:100 mit Wasser) wurde einmal täglich per Schlundsonde (4ml/Tier) appliziert.

b: Die Messung erfolgte 24 h nach der letzten Kotgabe

c: Sulfaguanidin (Resulfon S) wurde einmal täglich einer Dosis von 200 mg/kg per os gegeben. Die Messung erfolgte 24 h nach der letzten Gabe.

d: Die Tiere hatten vor der Kotapplikation chronisch 20% Ethanol und 0,25% Saccharin im Trinkwasser erhalten. Zu Beginn dieser Behandlung atmeten sie 0,190 ± 0,054 µMol pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht ab. Während der Kot- und Sulfaguanidinapplikation erhielten sie weiterhin Ethanol/Saccharinlösung als Getränk.

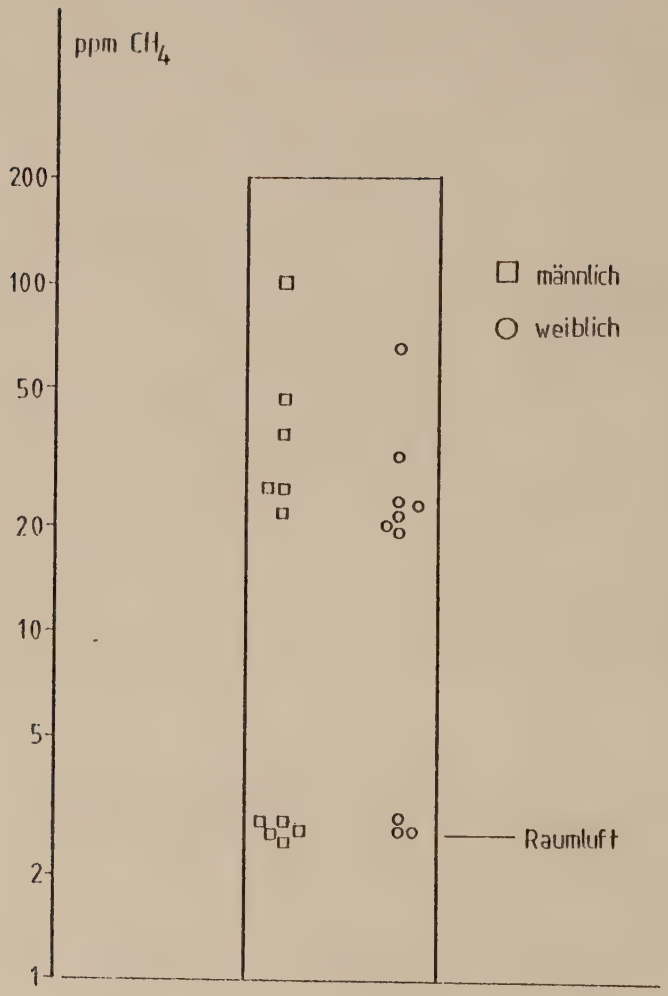


Abbildung 3.32.: Methankonzentration in der endexpiratorischen Luft von gesunden Freiwilligen.

5. Diskussion

Bereits 1967 hatte Di Luzio (Di Luzio und Hartman, 1967) die Hypothese aufgestellt, daß Ethanol seine hepatotoxische Wirkung, die beginnend mit einer Verfettung der Parenchymzellen über eine Hepatitis mit nachfolgender Fibrose zur irreversiblen Leberzirrhose und Leberversagen führt, durch Begünstigung der Lipidperoxidation in den Membransystemen dieses Organs ausübt. Tatsächlich zeigte sich in der Folgezeit, daß Ethanol in vitro die Produktion von Malondialdehyd in Leberhomogenaten stimuliert. Eine Reihe von Arbeitsgruppen versuchte daraufhin, Lipidperoxidation nach Ethanolapplikation auch in vivo nachzuweisen, indem post mortem der Malondialdehydgehalt der Leber oder die Konzentration an konjugierten Dienen bestimmt wurde. Diese Arbeiten waren aber zum Teil erfolglos oder führten zu unübersichtlichenErgebnissen (Plaa und Witschi, 1976).

Durch Verwendung einer neuen, nichtinvasiven Methode, nämlich der Bestimmung kurzkettiger Kohlenwasserstoffe in der Atemluft von Labortieren, wurde die Frage nach der prooxidativen Kapazität von Ethanol erneut untersucht, denn Ethan und n-Pentan entstehen bei der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren und können als Parameter für in vivo ablaufende Lipidperoxidation benutzt werden (Tappel, 1980). Tatsächlich konnten Köster et al. (1977) Ethanvermehrung in der Atemluft von Ratten bestimmen, wenn die Tiere eine Ethanoldosis erhalten hatten. Litov et al. (1978) fanden dagegen nur dann eine verstärkte n-Pentanabatmung nach einer akuten Ethanolapplikation, wenn die Tiere zuvor eine Vitamin-E-Mangeldiät erhalten hatten. Um diesen Widerspruch zu klären, wurde eine Methode entwickelt, die die gleichzeitige gaschromatographische Bestimmung beider Kohlenwasserstoffe in der Atemluft von Labortieren erlaubte. Im Vergleich mit dem bekannten Prooxidans Bromtrichlormethan sollte so erneut das Problem der Ätiologie der alkoholischen Lebererkrankung angegangen werden.

5.1. Lipidperoxidation in isolierten Hepatozyten

Isolierte Parenchymzellen aus Rattenlebern haben sich als gutes Testsystem für die Untersuchung der durch Nukleotid-komplexierte Eisenionen ausgelösten Lipidperoxidation erwiesen (Högberg et al., 1975 a, b, c).
Durch ihre Fähigkeit mit Hilfe ihrer mikrosomalen Elektronentransportkette Bioaktivierungen von Fremdstoffen durchzuführen (Moldeus, 1978), eignen sie sich zum Studium von Substanzen, deren Potential zur Auslösung von Lipidperoxidation an ihren Stoffwechsel gekoppelt ist. Lindström und Anders (1978) konnten aber CCl_4-induzierte Lipidperoxidation, die auf der Bildung freier Radikale durch die homolytische Spaltung einer Halogen-Kohlenstoff-Bindung des Moleküls beruht (Slater, 1972), nur in Hepatozyten beobachten, deren Gehalt an reduziertem Glutathion durch Vorbehandlung der Spendertiere mit Diethylmaleat stark vermindert war. In Hepatozyten aus gefütterten, unbehandelten Ratten konnten diese Autoren wie Stacey und Priestley (1978) nach Tetrachlorkohlenstoffzusatz keine Malondialdehydentwicklung als Indikator für Lipidperoxidation finden. In der vorliegenden Arbeit waren die Tiere, aus deren Lebern die Hepatozyten isoliert worden sind, vor der Tötung 24 Stunden nüchtern gehalten worden, wodurch der Glutathiongehalt der Zellen ebenfalls abgesenkt wird (Tateishi et al., 1974). Da die Glutathionperoxidase durch Lipidperoxidation gebildete Fettsäurehydroperoxyde mit Hilfe von reduziertem Glutathion zu nicht-reaktiven, stabilen Hydroxyfettsäuren umsetzt, die nicht mehr zu Malondialdehyd zerfallen (Kosower und Kosower, 1976), kann eine Verarmung der Zelle an Glutathion zu einem Anstieg an Hydroxyperoxyfettsäuren und durch deren Zerfall zu einem Anstieg der Malondialdehydkonzentration führen. Obwohl Malondialdehyd als cytotoxische Substanz schnell metabolisch eliminiert wird (Recknagel, 1967), können so größere Mengen in den Hepatozyten nachgewiesen werden, denn in der vorliegenden Arbeit konnte nach Tetrachlorkohlenstoff eine geringfügige Lipidperoxidation beobachtet werden. Tat-

sächlich erreichte die Konzentration an reduziertem Glutathion in den hier verwendeten Hepatozyten aus gefasteten Ratten zu Beginn der Inkubation nur 50 Prozent der Werte, die von Högberg et al. (1975c) in Hepatozyten aus gefütterten Tieren bestimmt worden sind:
10,3 nMole/10^6 Zellen gegenüber 21 nMole/10^6 Zellen.

Wie schon von Köster-Ahlbrecht et al. (1978) beschrieben, löst das im Vergleich zu Tetrachlorkohlenstoff wesentlich stärkere Hepatotoxin Bromtrichlormethan (BTM) (Koch et al., 1974) in Hepatozyten eine massive Lipidperoxidation aus (Abb. 3.2.). Diese Autoren haben bei der Applikation von BTM Ethanol als Lösungsmittel verwendet. Da Plaa et al. (1975) berichtet haben, daß Ethanol die hepatotoxische Wirkung chlorierter Methane verstärkt, wurde die Interaktion von Ethanol und BTM untersucht. Ethanol selbst führte zu keiner Verstärkung der Malondialdehydentwicklung, zeigte aber in einer Konzentration von 112 mM im Inkubationsansatz cytotoxische Wirkungen: Bei Zellen aus unbehandelten, gefasteten Ratten trat vermehrt Lactatdehydrogenase ins Inkubationsmedium aus (Abb. 3.8.), was als Schädigung der Plasmamembran zu deuten ist (Remmer et al., 1977). Außerdem sinkt der Glutathionspiegel während der Inkubation schneller ab (Abb. 3.10.). Dieser Effekt wurde von Vina et al. (1978, 1980) bereits in isolierten Hepatozyten beschrieben. Videla et al. (1980) haben zeigen können, daß Ethanolapplikation in vivo den Leberglutathionspiegel absenkt. Beide Arbeitsgruppen diskutieren als Mechanismus die reversible Bindung von Acetaldehyd an reduziertes Glutathion, also die Bildung eines Thioacetals. Vorinkubation der Hepatozyten mit 100 mM Ethanol resultiert in einer deutlichen Verstärkung der durch BTM hervorgerufenen Lipidperoxidation (Abb. 3.2.). Auch die Vorbehandlung der Ratten mit einer oralen Ethanoldosis von 5 g/kg 12 Stunden vor der Leberzellpräparation verstärkt die Bromtrichlormethanwirkung. Es wurde ein steilerer Anstieg der Malondialdehydkonzentration und ein höherer Endwert erreicht als bei Zellen aus unbe-

handelten Ratten. Dieser Effekt ließ sich durch zusätzliche Vorinkubation der Hepatozyten mit 100 mM Ethanol noch weiter steigern. Dabei ist Ethanol selbst an diesem Effekt nicht beteiligt. Wie Blutalkoholbestimmungen ergaben, war 12 Stunden nach einer Ethanoldosis von 5 g/kg kein Restalkohol mehr im Blut der Tiere nachzuweisen (nicht dargestellt). Zum anderen hätten geringe Spuren von Ethanol während der Perfusion der Leber bei der Zellgewinnung entfernt werden müssen. Möglicherweise hat aber die Ethanolintoxikation der Ratten zu einer Verarmung an Antioxidantien geführt. Wenn auch Videla et al. (1980) die Normalisierung der Leberglutathionkonzentration nach der metabolischen Elimination des Ethanols beschrieben haben, kann vermutet werden, daß nicht alle Glutathionpools wieder optimal gefüllt sind. Tateishi et al. (1974) haben auf das Vorhandensein mehrerer solcher Pools hingewiesen. Alternativ senkt Ethanol aber auch die Konzentration lipoidlöslicher Antioxidantien (DiLuzio und Hartman, 1969) und führt so zu einer Verstärkung der BTM-induzierten Lipidperoxidation. Wurden die Hepatozyten 36 h nach der Ethanolgabe gewonnen, so ließ sich kein Einfluß auf die BTM-induzierte Lipidperoxidation mehr nachweisen. Wie Abb. 3.2. zeigt, entspricht der Verlauf der Malondialdehydentwicklung dabei unter allen Bedingungen dem, der mit Zellen aus unbehandelten Tieren erhalten wurde. Die durch Ethanol hervorgerufenen Veränderungen sind also in diesem Zeitraum wieder aufgehoben.

Hepatozyten aus weiblichen Ratten sind gegenüber BTM weniger empfindlich. Der beobachtete langsamere Anstieg der Malondialdehydkonzentration sowie der nach zweistündiger Inkubation erzielte niedrigere Endwert sind als Ausdruck der geringeren metabolischen Aktivierung von BTM durch die weiblichen Cytochrom P-450-Isoenzyme zu deuten. Sexualdimorphismus hinsichtlich der Fähigkeit zum Fremdstoffmetabolismus beruht auf der Sexualhormon-bedingten Induktion verschiedener Cytochrom P-450-Spezies (Hayes, 1975) und äußert sich

in unterschiedlicher Susceptibilität gegenüber toxischen Substanzen in vivo (Hurst, 1958). Die in diesem Zusammenhang beschriebene geringere Toxizität von Ethanol gegenüber weiblichen Ratten zeigt sich in dem verminderten Effekt einer einmaligen Ethanolvorbehandlung der weiblichen Zellspender 12 Stunden vor der Zellisolierung auf die BTM-induzierte Lipidperoxidation. Hier löste die Inkubation mit 0,5 mM BTM die gleiche Malondialdehydentwicklung aus wie bei Zellen aus unbehandelten Weibchen, und 1 mM BTM führte nur zu geringfügig, aber signifikant höheren Malondialdehydkonzentrationen. Die Vorbehandlung der Zellen aus weiblichen Tieren mit und ohne akute Ethanolvorbehandlung führte aber wie bei Zellen aus männlichen Tieren zu einer stärkeren Lipidperoxidation nach 1 mM BTM (Abb. 3.3.). Ein weiterer Grund für die geringere Empfindlichkeit der Zellen aus weiblichen Ratten gegenüber BTM kann aber auch in der Tatsache bestehen, daß die dabei gebildeten Fettsäurehydroperoxyde nicht im gleichen Maß wie bei Zellen aus männlichen Tieren zu Malondialdehyd zerfallen, sondern bevorzugt von der Glutathionperoxidase umgesetzt werden. Es ist durch die Arbeiten von Pinto und Bartley (1969a, b) bekannt, daß der bei weiblichen Ratten vorliegende höhere Östrogenspiegel zu einer Vermehrung der Aktivität dieses Enzyms führt. Dabei wird der Schutz der Zelle vor Malondialdehydformation nicht durch das H_2O_2--abhängige Selenoenzym (EC 1.11.1.9.), sondern durch die peroxidative Aktivität verschiedener Glutathion-S-Transfereasen (EC 2.5.1.18) gewährleistet (Burk et al., 1980).

Wird die Leber nicht nur einer einmaligen Ethanoldosis ausgesetzt, sondern die Ethanolbehandlung über den Zeitraum von Wochen durchgeführt, so erhöht sich die Triglyceridmenge in den Hepatozyten nicht unbegrenzt. Als Adaptionsmechanismus findet sich eine Dämpfung der durch Ethanol bewirkten Erhöhung des NADH/NAD-Verhältnisses. Die Arbeitsgruppe um Israel (Videla et al., 1973; Bernstein et al., 1973) konnte zeigen, daß die beschleunigte Reoxidation von

NADH nach chronischer Ethanolbehandlung durch den dadurch provozierten hypermetabolischen Zustand bewirkt wird. Dieser Zustand ist durch erhöhten Sauerstoffverbrauch der Leber, erhöhte NADH-Oxidation, erhöhte ATP-Produktion und erhöhte ATP-Utilisation durch die Na/K-Adenosintriphosphatase der Zellmembran gekennzeichnet. Da die Reoxidation von NADH der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Ethanolabbau über die Alkoholdehydrogenase ist, kann unter diesen Bedingungen auch mehr Ethanol umgesetzt werden. Videla et al. (1973) konnten dies an Leberschnitten und Thurman und Scholz (1976) an der isoliert perfundierten Leber demonstrieren. Alternativ wird für die gesteigerte mitochondriale Atmung ein Nachlassen der energetischen Kopplung verantwortlich gemacht (Haselbach, 1980). Danach kommt es unter chronischer Ethanolbehandlung zu einer Veränderung des Fettsäuremusters in den Lipiden der Mitochondrienmembranen, die zu einer größeren Protonenpermeabilität, also einer Verringerung des Protonengradienten, und zu einer Abnahme der energieabhängigen Kalium- und Calziumaufnahme führt. Acetaldehyd wird dagegen nach chronischer Belastung mit Ethanol nur noch zu einem geringeren Ausmaß verstoffwechselt. Hasamura et al. (1975) konnten die verminderte Veratmung dieses Metaboliten durch Lebermitochondrien demonstrieren. Durch die verstärkte NADH-Reoxidation wird die durch Ethanol hervorgerufene Hemmung der Fettsäureoxidation aufgehoben und die Fettsäureneusynthese verringert. Weiterhin führt der vermehrte Export von Triglyceriden mit Hilfe der jetzt vermehrt synthetisierten Lipoproteine zu einem Rückgang der Leberverfettung.

Auch in den vorliegenden Versuchen wurden Ratten chronisch mit Ethanol behandelt. Dabei konnte bei ihnen, wie auch bei den Tieren, die als Kontrollen isokalorische Kohlehydratlösungen als Getränk bekommen hatten, zum Zeitpunkt der Zellgewinnung keine Verfettung der Leber (Überberg, 1979) beobachtet werden. Die Blutethanolclearance war bei Ethanol- und Normaltieren gleich (nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu Remmer et al. (1977) löste BTM in Zellen, die aus Tieren mit chronischer Belastung durch Ethanol/Glucose-Lösung gewonnen worden sind, die gleiche Malondialdehydentwicklung aus wie in Zellen aus unbehandelten Tieren (Abb. 3.5.). Wurde, wie in dieser Arbeit beschrieben, BTM zusammen mit 112 mM Ethanol zu den Zellen zugesetzt, so konnte die Malondialdehydkonzentration weiter gesteigert werden. Dies korreliert gut mit dem in Abbildung 3.8. dargestellten Austritt an Lactatdehydrogenase aus den Zellen von Ethanoltieren unter dem gleichzeitigen Einfluß beider Hepatotoxine. Daß Ethanol aber die Integrität der Mitochondrien beeinflußt, zeigt die verstärkte Sensibilität gegenüber BTM. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, verlieren Hepatozyten aus Ethanol/Glucose-Tieren unter BTM wesentlich größere Mengen an dem mitochondrialen Enzym Glutamatdehydrogenase als Zellen aus unbehandelten Kontrollratten. Veränderungen der Mitochondrienmorphologie gehören neben der Verfettung zu den ersten Anzeichen der Ethanolwirkung auf die Leber (Iseri et al., 1966), wobei die mitochondriale Läsion im Gegensatz zur Verfettung durch prolongierte Ethanolaufnahme nicht über Adaptionsmechanismen wieder vermindert wird.

Im Gegensatz zu Remmer et al. (1977) waren in den vorliegenden Versuchen Hepatozyten von Tieren gewonnen worden, die 24 Stunden ohne Festfutter waren. Dies führt zu einem starken Abfall des intrazellulären Glutathionspiegels (Tateishi et al., 1974) und damit zu einer erhöhten Empfindlichkeit bereits der Zellen aus Kontrolltieren gegenüber Prooxidantien. Damit könnte der von Remmer et al. beobachtete spezifische Effekt der Ethanolvorbehandlung maskiert werden, Zellen aus Kontroll- und Ethanol/Glucoseratten werden also durch BTM gleichermaßen stark geschädigt. Weiterhin wurden in den vorliegenden Versuchen die chronisch Ethanol konsumierenden Tiere 24 Stunden vor der Präparation vom Ethanol abgesetzt und mit Wasser versorgt, während bei Remmer et al. die Ethanolbehandlung bis zur Zellgewinnung

beibehalten wurde. Da Ethanol nach Vina et al. (1980) und Valenzuela et al. (1980) zu einer Senkung des hepatischen Glutathionspiegels führt, ist also davon auszugehen, daß bei Befunden von Remmer et al. Kontrollzellen mit optimalem Glutathiongehalt durch kontinuierliche Fütterung der Zellspender solchen aus Ethanol/Glucose-Ratten gegenübergestellt wurden, die einen verminderten Spiegel dieses Antioxidants aufwiesen. So könnte die unterschiedliche Empfindlichkeit der Hepatozyten bei diesen Autoren erklärt werden. Auch die Dauer der chronischen Ethanolvorbehandlung differiert. Hatten die Ratten bei Remmer et al. mindestens 4 Monate lang eine Ethanol/Glucose-Lösung konsumiert, so wurden die Tiere in der vorliegenden Untersuchung bereits nach der Hälfte der Zeit zur Zellgewinnung verwendet. Es besteht also auch die Möglichkeit, daß der durch Ethanol ausgelöste Effekt, der zu der erhöhten Empfindlichkeit der Hepatozyten gegenüber BTM führt, noch nicht voll ausgeprägt war. In den hier berichteten Befunden konnte allein die mitochondriale Läsion nach chronischer Ethanoleinwirkung bestätigt werden.

Auch die chronische Applikation einer Kohlehydratlösung führt bei Ratten zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber BTM. Da die Tiere in diesen Versuchen mehr als 50 Prozent ihres Energiebedarfs aus der Saccharoselösung deckten, lag der Verdacht nahe, daß der in Abb. 3.8. dargestellte geringfügige, aber nicht signifikante Anstieg der Lactatdehydrogenasekonzentration auf einem Mangelsyndrom beruhen könnte. Tatsächlich zeigte sich, daß Vitamin E einen Schutz vor Lipidperoxidation darstellt: Zellen aus Ratten, die mit Vitamin E-freier Diät ernährt worden waren, zeigten bereits bei der Inkubation ohne Zusätze eine starke Malondialdehydentwicklung, die durch BTM-Applikation noch zusätzlich gesteigert werden konnte (Abb. 3.6.). Auch hier führte die Vorinkubation der Zellen mit 100 mM Ethanol, wie bereits bei den Versuchen mit Zellen aus unbehandelten Tieren beschrieben, zu einer Verstärkung der

BTM-Wirkung. Eine zusätzliche Schädigung der Leber neben dem Vitamin E-Mangel enthüllt die Auftragsweise in Abb. 3.7.: Nach Abzug der endogenen Lipidperoxidation zeigt sich, daß die zusätzliche chronische Ethanolapplikation bei Vitamin E-frei ernährten Tieren zu einer stärkeren Lipidperoxidation durch BTM führt als wenn die Versuche mit Hepatozyten durchgeführt wurden, die von Tieren stammten, die neben der Vitamin E-freien Diät eine isokalorische Saccharoselösung erhalten hatten. Es wird allgemein angenommen, daß Vitamin E durch Abfangreaktion mit freien Radikalen das Entstehen von Hydroperoxyden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren verhindert und so einen Schutzfaktor für biologische Membranen darstellt (Tappel, 1965; Slater, 1972; Hoekstra, 1975; McCay et al.; 1970; Pryor, 1976; Nakamura und Hishinuma, 1978).

Zellen aus Tieren, die chronisch mit Ethanol und Saccharose behandelt wurden, zeigen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber BTM als Zellen, die aus Tieren stammten, die Ethanol zusammen mit Glucose erhalten haben. Dies äußerte sich in verminderter Malondialdehydentwicklung (Abb. 3.5.), geringerem Lactatdehydrogenaseaustritt (Abb. 3.8.) und geringerer Freisetzung von Glutamatdehydrogenase (Abb. 3.9.). Offensichtlich schützt die durch diese Behandlung bedingte hohe Fruktosezufuhr vor der hepatotoxischen Wirkung des Ethanols. Fruktose beschleunigt den Ethanolstoffwechsel durch den vermehrten Verbrauch von NADH (Grunnet et al., 1973). Gleichzeitig führt die Conversion von Fruktose zu Glucose zu einem erhöhten Bedarf an ATP und so zu einer beschleunigten Reoxidation von NADH über die Atmungskette (Scholz und Nohl, 1976).

5.2. Lipidperoxidation in vivo

Bei den Versuchen mit Rattenleberhepatozyten hatte sich gezeigt, daß der Zusatz von Ethanol zum Inkubationsmedium allein unter keinen der untersuchten Bedingungen zu einer erhöhten Malondialdehydbildung geführt hat. Dies läßt sich nur so erklären, daß a) Ethanol in diesem System keine Lipidperoxidation auszulösen vermag, b) unter Ethanoleinfluß entstehende freie Radikale sofort durch intrazelluläre Antioxidantien wie Vitamin E (Hoekstra, 1975) abgefangen werden, c) Fettsäurehydroperoxyde mit Hilfe der Glutathionperoxidase umgesetzt werden und so nicht zu Malondialdehyd zerfallen können (Tappel, 1975) oder gebildetes Malondialdehyd sofort verstoffwechselt wird (Recknagel, 1967; Haselbach, 1980). Malondialdehyd war auch im Ganztier nach Ethanoleinfluß nicht beobachtet worden (Plaa und Witschi, 1976).
Andererseits war von Litov et al. (1978) und Köster et al. (1977) in vivo in der Atemluft das Auftreten kurzkettiger Kohlenwasserstoffe als Ausdruck einer unter Ethanoleinfluß in Labortieren ablaufenden Lipidperoxidation beschrieben worden.

Da Riely et al. (1974) eine gute Korrelation zwischen der Ethanabatmung und Malondialdehydentwicklung nach CCl_4-Applikation und Sagai und Tappel (1979) eine Parallele zwischen n-Pentanabatmung und dem Auftreten konjugierter Diene in der Leber nach CCl_4 und Bromtrichlormethan (BTM) zeigen konnten, wurde eine Methode entwickelt, die die gleichzeitige Bestimmung von n-Pentan und Ethan in der Atemluft von Labortieren erlaubte, nämlich die gaschromatographische Auftrennung der Atemgasproben an Porasil C (Frank et al., 1980a). Damit konnte gezeigt werden, daß bereits 15 Minuten nach Applikation von BTM eine deutliche Freisetzung verschiedener Kohlenwasserstoffe durch Labortiere induziert werden kann (Abb. 3.12.). Diese Kohlenwasserstoffabatmung ist über eine Stunde linear (Abb. 3.13.)

und abhängig von der zugeführten BTM-Dosis (Abb. 3.14.). Daß die Abatmung der Gase tatsächlich ein Ausdruck der durch BTM ausgelösten Lipidperoxidation ist und nicht aus mikrobiellen Prozessen der Darmflora stammt, konnte durch Versuche mit der isoliert perfundierten Rattenleber demonstriert werden. Die Gase, die nach Zusatz von BTM im Gasraum der Perfusionsapparatur entstehen, sind qualitativ (Abb. 3.26.) und quantitativ (Tabelle 3.3..) identisch mit den flüchtigen Spaltprodukten ungesättigter Fettsäuren, die in vivo nach einer identischen BTM-Dosis abgeatmet werden.
Die quantitative Gleichheit konnte aber nur erzielt werden, wenn die Leber unter verringertem Sauerstoffdruck perfundiert wurde, wie er auch in vivo vorliegt (Sies, 1977). Bei höheren Sauerstoffdrucken kommt es, wie schon von Nastalncyk et al. (1978) für Halothan und von Kleczka und Kappus (1980) für CCl_4 beschrieben, zu einer Kompetition zwischen Sauerstoff und Organhalogen um das aktive Zentrum von Cytochrom P-450 und damit zu einer verminderten metabolischen Aktivierung von BTM. Durch die verminderte Zahl von freien Radikalen ist somit die Initiation der Lipidperoxidation vermindert.

Auch die Applikation von Ethanol resultierte in einem Ansteigen von kurzkettigen Kohlenwasserstoffen in der Atemluft von Ratten (Abb. 3.15.). Wie bereits von Köster et al. (1977) beschrieben, war die Ethanabatmung erhöht. Auch die von Litov et al. (1978) gezeigte erhöhte n-Pentanfreisetzung konnte bestätigt werden. Daneben stieg aber eine Reihe weiterer Kohlenwasserstoffe an. Einige davon sind bereits früher in der Atemluft von Ratten festgestellt worden (Dillard et al., 1977), aber i-Butan, i-Pentan und i-Buten sind bisher noch nicht erwähnt worden. Ob diese Substanzen der Ausdruck der Lipidperoxidation sind, kann aus den vorliegenden Versuchen nicht geschlossen werden. Besonders i-Buten, dessen Identität durch Gaschromatographie/Massenspektroskopie, wobei die beiden charakteristi-

schen Ionen m/e 56 und 41 überprüft wurden, weiter gesichert wurde, kann nicht aus dem üblichen peroxidativen Abbau von Membranlipiden stammen.
Das gleiche gilt für die anderen Isoalkane, da verzweigte Fettsäuren in Zellmembranen extrem selten sind. Interessanterweise sind alle nach Ethanolgabe gefundenen Kohlenwasserstoffe, wenn auch in geringerer Konzentration, auch in der Atemluft unbehandelter Tiere nachzuweisen. Dies ist ein Hinweis auf eine permanent im Organismus ablaufende Lipidperoxidation auf einem sehr niedrigen Niveau. In welchen Organsystemen diese Lipidperoxidation abläuft, kann zur Zeit nicht geklärt werden. Gegen die Leber sprechen die Befunde aus der isoliert perfundierten Rattenleber. Möglicherweise stammen die endogen gebildeten Kohlenwasserstoffe aus Nebenwegen der Prostaglandinsynthese. Applikation des Prostaglandinsynthesehemmers Acetylsalicylsäure in vivo (Flower, 1974) führte zu einem starken Rückgang der n-Pentanfreisetzung (Kessler, 1980).
Damit ließe sich auch das sowohl qualitativ als auch quantitativ unterschiedliche Muster der abgeatmeten Kohlenwasserstoffe bei Tieren unterschiedlichen Geschlechts (Abb. 3.17.) und unterschiedlicher Spezies (Abb. 3.18.) deuten, da die Kapazität zur Synthese von Prostaglandinsäuren speziesabhängig ist und innerhalb einer Spezies vom Geschlecht des Versuchstiers abhängt (Flower, 1974).

Die Verfolgung der endogenen Kohlenwasserstoffe über einen längeren Zeitraum enthüllte ein wichtiges Phänomen, das half, die vermutete Kohlenwasserstofffreisetzung durch Ethanol zu erklären. Die Entwicklung der Gase verläuft nicht linear (Abb. 3.16.), sondern die Konzentration/Zeit-Kurven nähern sich Sättigungs- bzw. Gleichgewichtskonzentrationen. Dies führte zu der Überlegung, daß Reinhalation der Kohlenwasserstoffe und nachfolgende Metabolisierung im Versuchstier die Exhalation überlagern. Frommer et al. (1970) konnten zeigen, daß Kohlenwasserstoffe durch Lebermikrosomen zu den entsprechenden Alkoholen metabolisiert werden.

Wurden die Versuchstiere einer Kohlenwasserstoffhaltigen Atmosphäre ausgesetzt, so konnte in Übereinstimmung mit Frommer et al. (1970) gezeigt werden, daß die Geschwindigkeit der metabolischen Elimination mit steigendem Molekulargewicht der jeweils untersuchten Kohlenwasserstoffe ansteigt (Abb. 3.30.)
Wie bereits von Siegert et al. (1964) für den mikrosomalen Stoffwechsel von Barbituraten und Dimethylaminopyrin beschrieben, finden sich auch für die Geschwindigkeit der in vivo Elimination der Kohlenwasserstoffe geschlechts- und spezlesabhängige Unterschiede (Tabellen 3.4. - 3.9.). Induktoren der mikrosomalen Monooxygenasen wie Phenobarbital (Conney, 1967; Remmer et al., 1967) verkürzten außer für Ethan die Eliminationshalbwertszeiten der Kohlenwasserstoffe, wenn Sprague-Dawley Ratten (Sublinie SIV) im Versuch eingesetzt wurden. Induktion mit Methylcholanthren (Conney und Gilman, 1963) war weniger wirksam, wie bereits von Bolt et al. (1976) für die Elimination von Vinylchlorid gezeigt.

Ein signifikanter Abfall der Eliminationsgeschwindigkeit konnte beobachtet werden, wenn die Versuchstiere vor der Exposition mit Kohlenwasserstoffen mit Substanzen behandelt worden sind, die allgemein als Hemmstoffe der Fremdstoffhydroxylierung angesehen werden. Deutlich gehemmter Metabolismus zeigte sich, wenn die Tiere Ethanol (Schüppel, 1969), Tetrahydrofuran (Ullrich et al., 1975), Diethyldithiocarbamat (Siegers et al., 1978) oder Propandiol (Dean und Stock, 1974) erhalten hatten.
SKF 525-A, Metarapon und Benzoflavon zeigten keinen Effekt.Benzoflavon wird als spezifischer Inhibitor von Cytochrom P-448-abhängigen Reaktionen angesehen (Wiebel et al., 1971), während Metyrapon speziell die Phenobarbital-induzierbare Cytochrom P-450-Fraktion hemmt (Hultmark et al., 1979; Hildebrandt, 1972). Das Fehlen einer Hemmwirkung von SKF 525-A auf die Vinylchloridelimination in vivo ist bereits von Bolt et al (1976) beschrieben worden. Von Ullrich et al.

(1975) ist die Existenz einer weiteren Cytochrom P-450-Spezies beschrieben worden, die durch chronische Ethanolvorbehandlung induziert und durch Ethanol sowie Tetrahydrofuran gehemmt werden kann. Wenn auch eine erhöhte Kohlenwasserstoffelimination nach chronischer Ethanolvorbehandlung nicht demonstriert werden konnte, wobei allerdings nicht so drastisch vorgegangen wurde wie bei Ullrich et al. (1975) (nicht dargestellt),so kann aus dem Induktions- und Hemmuster geschlossen werden, daß die durch Ethanol beeinflußbare Cytochrom P-450-Fraktion für den Metabolismus der Kohlenwasserstoffe verantwortlich ist. Allerdings können auch andere Cytochrom P-450-Isoenzyme zum Stoffwechsel beitragen, da sie alle nur geringe Substratspezifitäten aufweisen (Haugen et al., 1975; Lu, 1979).

Die aus den Inhalationsversuchen gewonnenen kinetischen Parameter wurden zur Klärung der Frage verwendet, ob der durch Ethanolapplikation hervorgerufene Anstieg der Kohlenwasserstoffe in der Atemluft von Ratten durch Lipidperoxidation hervorgerufen wird, oder ob dieses Phänomen allein auf der Tatsache beruht, daß Ethanol die nach der Reinhalation im Organismus stattfindende Metabolisierung hemmt. Wie Tabelle 5.1. zeigt, konnte die Hemmwirkung auf den Metabolismus von Ethan, Propan, n-Butan und n-Pentan für den Anstieg dieser Kohlenwasserstoffe verantwortlich gemacht werden. Die berechneten Produktionsraten bei erreichtem Gleichgewicht entsprachen denen, die bei der Applikation von Ethanol, also bei gehemmtem Stoffwechsel, bestimmt worden sind. Dieser Befund bedeutet, daß bei der Überprüfung der Lipidperoxidation in vivo mit Hilfe des Kohlenwasserstoffgehalts auch an die Möglichkeit einer Hemmwirkung auf die Mikrosomen gedacht werden muß. Besonders wenn der Anstieg der Kohlenwasserstoffe nur gering ist, kann der Hemmeffekt von Fremdstoffen als Lipidperoxidation mißinterpretiert werden. Solche geringen Anstiege wurden nach Applikation von Cytochrom P-450-Hemmern wie Diethyldithiocarbamat (Abb. 3.23. und 3.25.) und nach Tetrahydro-

Tabelle 5.1.: Berechnete und beobachtete Kohlenwasserstoffabatmung bei männlichen Wistar Ratten

	Clearance (Cl) (l/h x 200g)	y" (nMole/l)	v (y" x Cl)	Δy bei Hemmung berechnet (nMole/l x h)	ΔN bei Hemmung berechnet (nMole/kg)	ΔN^a bei Hemmung beobachtet (nMole/kg)	ΔN_{tot} (nMole/kg) berechnet
Ethan	0,085	3,70	0,315	0.22	0,55	0,55	0,77
Propan	-	-	-	-	-	0,75	-
n-Butan	-	-	-	-	-	0,60	-
n-Pentan	0,226	0,9	0.20	0.223	0,55	0,45	1,1
i-Buten	-	-	-	-	-	2,20	-

y": Kohlenwasserstoffkonzentration im Gleichgewicht

v : Kohlenwasserstoffzufuhr in das System

Δy : Zunahme der Kohlenwasserstoffkonzentration

ΔN : in den Gasraum abgegebene Menge bei gehemmtem Stoffwechsel

a : Ethanol als Hemmstoff (5 g/kg p.o.)

ΔN_{tot}: Konlenwasserstoffzunahme im Gesamtsystem (Tier + Gasraum) bei gehemmtem Stoffwechsel

Tabelle 5.2.: Berechnete und beobachtete Kohlenwasserstoffabatmung bei männlichen Sprague-Dawley Ratten (Sublinie SIV)

	Clearance (Cl) (l/h x 200g)	y" (nMole/l)	v (y" x C)	Δy bei Hemmung berechnet (nMole/l x h)	ΔN bei Hemmung berechnet (nMole/kg)	ΔN^a bei Hemmung beobachtet (nMole/kg)	ΔN_{tot} (nMole/kg) berechnet
Ethan	0,10	6,86	0,685	0,48	1,20	1,20	1,40
Propan	0,28	3,78	1,06	0,72	1,80	1,80	2,55
n-Butan	0,31	2,72	0,83	0,60	1,50	1,50	2,16
n-Pentan	0,46	1,18	0,55	0,60	1,50	1,50	2,72
i-Buten	0,56	0,24	0,135	0,086	0,215	2,50	0,275

y" : Kohlenwasserstoffkonzentration im Gleichgewicht

v : Zufuhr von Kohlenwasserstoffen in das System

Δy : Zunahme der Konzentration des Kohlenwasserstoffs

ΔN : in den Gsraum abgegebene Kohlenwaserstoffmenge bei gehemmtem Stoffwechsel

a : Diethyldithiocarbamat als Hemmstoff (100 mg/kg i.p.)

ΔN_{tot} : Kohlenwasserstoffzunahme im Gesamtsystem (Gasraum + Tier bei gehemmtem Stoffwechsel

furan (nicht dargestellt) beobachtet. Durch die Annahme eines Hemmeffektes von Ethanol auf den Stoffwechsel von Kohlenwasserstoffen kann auch das Fehlen einer Dosis-Wirkungsbeziehung für Ethanol (Abb. 3.22.) erklärt werden. Solange Ethanol in ausreichender Konzentration im Organismus zur Verfügung steht (Abb. 3.21.), ist die Kohlenwasserstoffkonzentration in der Atemluft der Versuchstiere erhöht.
Auch das Fehlen eines Phenobarbitaleffektes auf die durch Ethanol bewirkte verstärkte Kohlenwasserstoffabatmung wird erklärbar: Im Gegensatz zu CCl_4, das in Phenobarbital-vorbehandelten Ratten eine stärkere Ethanfreisetzung hervorrief als bei unbehandelten Kontrolltieren (Lindström und Anders, 1978), konnte bei Mäusen keine verstärkte Gasabatmung nach Ethanol beobachtet werden, wenn die Tiere mit Phenobarbital vorbehandelt waren. Ethanol führt offensichtlich nicht zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen im endoplasmatischen Retikulum, die, wie bei den Methylhalogeniden, Lipidperoxidation initiieren können.

Ethanolvorbehandlung führte bei männlichen, nicht aber bei weiblichen Ratten zu einer Veränderung des Atemkohlenwasserstoffmusters. Das bei weiblichen Ratten auftretende Fehlen von Ethan und Ethylen auch nach Stimulierung durch akute Ethanoldosen oder Diethyldithiocarbamat entwickelt sich bei männlichen Tieren erst nach chronischer Ethanolvorbehandlung (Abb. 3.17., 3.24., 3.25. und Tabelle 4.3.). Diese Angleichung des Kohlenwasserstoffmusters könnte ein Ausdruck des bei chronischem Ethanolkonsum gestörten Testosteronstoffwechsels in der Leber (Rubin et al., 1976) und den Leydig'schen Zwischenzellen (Ellingboe und Varanelli, 1979) sein, der bei Ratten und menschlichen Alkoholikern zu Hypogonadismus und Feminisierung führt (Gavaler et al, 1980). Dagegen spricht aber der nicht veränderte Arzneimittelmetabolismus (nicht dargestellt). Es könnte sich aber um den Ausdruck eines veränderten Fettsäuremusters

handeln.

Eine Sonderstellung unter den Kohlenwasserstoffen nimmt 1-Buten ein. Es trat nur bei den in vivo Versuchen, nicht aber im Gasraum des Leberperfusionssystems auf. In vivo konnte seine Abatmung durch Ethanol, Diethyldithiocarbamat und Tetrahydrofuran stimuliert werden, durch Substanzen also, deren Hemmwirkung auf den Kohlenwasserstoffmetabolismus durch die Inhalationsversuche nachgewiesen werden konnte. Tabelle 5.1. zeigt aber, daß die erhöhte Abatmung dieser Substanz nicht allein mit einer Hemmung ihres Stoffwechsels zu erklären ist: Es wird dreimal mehr 1-Buten abgeatmet als durch Berechnung der Produktion im Gleichgewicht zu erwarten wäre. Die Applikation von Fremdstoffen unterschiedlichster Klassen führt demnach zu einem gemeinsamen Prozeß im Organismus, der in der Freisetzung dieses Kohlenwasserstoffes seinen Ausdruck findet. Aus den vorliegenden Daten kann weder eine Angabe über die Natur dieses Prozesses noch über die Substanzen gemacht werden, aus denen 1-Buten entsteht.

5.3. Lipidperoxidation in Lebermikrosomen

Halogenierte Kohlenwasserstoffe wie CCl_4 und Bromtrichlormethan werden mit Hilfe mikrosomaler Monooxygenase verstoffwechselt, wobei als Zwischenprodukte freie Radikale entstehen können, die Lipidperoxidation initiieren können (Plaa und Witschi, 1976). Als die hier beschriebenen Versuche durchgeführt wurden, störte wegen noch nicht ausgereifter Analysentechnik jeder Zusatz von CCl_4 oder Bromtrichlormethan die Bestimmung der Kohlenwasserstoffe, die sich im Gasraum des Inkubationsgefäßes in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen bildeten.

Die Auslösung der Lipidperoxidation wurde deshalb auf eine andere Weise durchgeführt. Seit den Untersuchungen von Hochstein und Ernster (1963) ist bekannt, daß der Zusatz von NADPH zu Mikrosomen in Gegenwart von Sauerstoff zu Lipidperoxidation führt, da die dabei entstehenden OH-Radikale (Kellogg und Fridovich, 1975; Auclair et al., 1978) und O_2^--Radikale eine ähnliche Wirkung auf Membranlipide ausüben wie die aus Methylhalogeniden gebildeten Radikale, nämlich die Zerstörung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus den Phospholipiden (Högberg et al., 1973).

Es bestand auch hier der Verdacht, daß in diesem System eine größere Menge an Kohlenwasserstoffen entsteht, als ohne Hemmstoffzusatz im Gasraum bestimmt werden kann. Aus Untersuchungen von Slater (1972) und Lumper et al. (1968) ist bekannt, daß Kohlenmonoxyd zwar den Fremdstoffmetabolismus, nicht aber die Lipidperoxidation hemmt. Unter Kohlenmonoxydeinfluß werden durch das vorgeschaltete Flavinenzym Cytochrom c-Reduktase freie Radikale gebildet, alternativ wird die Aktivierung des Sauerstoffs durch ein Nichthämeisenprotein diskutiert. Wie Abb. 3.27. zeigt, ist die Bildung von Malondialdehyd in peroxidierenden Mikrosomen vor und nach Kohlenmonoxydzusatz identisch. Dagegen kommt es zu einem starken Anstieg der n-Pentanfreisetzung unter

dem Einfluß dieses Hemmstoffes. Es kommt also auch unter der Lipidperoxidation zu einer Überlagerung von Kohlenwasserstoffbildung und Kohlenwasserstoffmetabolismus.

Lipidperoxidation von Mikrosomen durch NADPH hängt von der Gegenwart komplexierter Eisenionen ab. Deshalb wurde ADP--komplexiertes Eisen zum Inkubationsansatz hinzugefügt (Marks und Hecker, 1967). Im Vergleich mit der allein durch NADPH induzierten Lipidperoxidation (Abb. 3.28.) führte dies zu einer massiven Steigerung der Lipidperoxidation, wie an dem Anstieg der Parameter Malondialdehydkonzentration sowie Ethan- und n-Pentanfreisetzung ersehen werden kann (Abb. 3.29.).
Wie bereits für die Lipidperoxidation mit NADPH allein gezeigt, kann die n-Pentan-Freisetzung durch Hemmung des Stoffwechsels mit Ethanol weiterhin gesteigert werden. Selbst unter dieser massiven Lipidperoxidation überlagern sich also n-Pentan-Bildung und Stoffwechsel. Werden Mikrosomen in Gegenwart von Komplexbildnern wie EDTA oder amphiphilen Substanzen wie SKF 525-A inkubiert, so bleiben Malondialdehydbildung (Hochstein und Ernster, 1963) und Kohlenwasserstoffentwicklung (nicht dargestellt) aus. Interessanterweise zeigen Mikrosomen aus Ethanolratten auch nach Stimulierung durch Ethanol unter diesen Bedingungen verminderte n-Pentanfreisetzung. Das Verhältnis von Malondialdehyd/Ethan/n-Pentan ist also verändert (Tabelle 5.3.). Ob diese Beobachtung auf einem veränderten Fettsäuremuster, einer veränderten Radikalreaktion oder einem veränderten Zerfallsprozeß beruht, kann mit den vorliegenden Meßergebnissen nicht geklärt werden.

Tabelle 5.3.: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Meßgrößen aus den Mikrosomenversuchen mit Fe-ADP und Ethanol

	Mikrosomen aus Kontrollratten	Mikrosomen aus Ethanolratten
Malondialdehyd (nMole/mg Protein x 10 Minuten)	120	122
Ethan (nMole/mg Protein x 10 Minuten)	0,37	0,24
n-Pentan (nMole/mg Protein x 10 Minuten)	1,52	0,84
Malondialdehyd/Ethan	324	508
Malondialdehyd/n-Pentan	78,9	145
n-Pentan/Ethan	4,1	3,5

5.4. Methanexhalation in vivo

Berichte von Bond et al. (1971) zeigten, daß die Kontamination keimfreier Ratten mit dem Kot von Tieren, deren Atemluft Methan enthielt, bei diesen ebenfalls zur Abatmung von Methan führte. Die Autoren schlossen daraus, daß im Kot methanogene Bakterien siedeln und daß Koprophagie zur Übertragung auf andere Tiere führt. Methanogene Bakterien sind auch im Verdauungstrakt von Wiederkäuern gefunden worden, wo sie Methan aus Cholin bilden (Neill et al., 1978).

Daß auch die in den vorliegenden Versuchen beobachtete Methanfreisetzung auf einer mikrobiellen Kontamination beruht, kann durch die folgenden Befunde belegt werden: Auch hier führte die Kontamination von nicht Methan abatmenden Ratten mit Kot von Ratten, die Methan abatmeten, zum Auftreten von Methan in der Atemluft (Tabelle 3.15.). Sogar die Applikation von Kot aus methanbildenden Tieren anderer Spezies (Tabelle 3.16.) überträgt methanogene Bakterien. Dabei ist die Überimpfung nur dann erfolgreich, wenn die Kotempfänger durch chronische Ethanolbehandlung oder durch eine andere Noxe geschwächt, bzw. das intestinale Milieu in einer das Anwachsen der methanogenen Bakterien fördernden Weise verändert ist. Chronische Ethanolapplikation führt zum Beispiel zu morphologischen Veränderungen der Darmmucosa (Lieber, 1980; Isselbacher, 1977). Spontanes Auftreten der Methanabatmung war bei Tieren beobachtet worden, die chronisch Ethanol als Getränk erhalten hatten oder einer Bestrahlung mit 600 Rad, die ebenfalls die Darmmucosa schädigt, unterworfen worden waren.

Auch der Befund, daß die Behandlung mit Antibiotika nach Rodkey und Collison (1977) die Methanabatmung verminderte (Tabelle 3.13.), läßt auf eine Beteiligung von Mikroorganismen schließen.

SKF 525-A hemmt das Wachstum methanogener Bakterien (Thauer, 1980) und so läßt sich die Abnahme von Methan in der Atemluft der Tiere (Tabelle 3.11.) als toxischer Effekt auf die mikrobielle Darmflora deuten. Ob Metyrapon ähnliche Wirkungen auf methanogene Bakterien ausübt, ist bisher nicht untersucht. Ähnlich wie SKF 525-A hemmt aber auch diese Substanz die Methanabatmung.

Methanogene Bakterien wandeln Kohlendioxyd und Wasserstoff in Methan um und sind deshalb auf die Anwesenheit von Mikroorganismen angewiesen, die Wasserstoff bei ihren Fermentationsprozessen entwickeln. So erklärt sich der starke Rückgang der Methanproduktion, wenn die methanbildenden Tiere fasteten (Gottschalk, 1979). Methanobakterium omelianskii, eine Lebensgemeinschaft aus dem sogenannten S-Organismus, der Ethanol zu Acetat reduziert und Methanobacterium MoH, das aus dem dabei gebildeten Wasserstoff und Kohlendioxyd Methan produziert, gehört aber nicht zu den hier beobachteten Mikroorganismen. Akute Ethanolapplikationen führten eher zu einem Rückgang der Methanabatmung, eine Stimulierung wurde unter Ethanol nicht beobachtet (nicht dargestellt). Also liegt keine Besiedlung mit Methanobakterium omelianskii vor.

Seit den Untersuchungen von Hungate (1975) ist bekannt, daß die mikrobielle Darmflora zum überwiegenden Teil aus Anaerobiern besteht. Es wird sogar vermutet, daß die im Darm auftretenden Aerobier in diesem Milieu nur existieren können, weil sie fakultativ auch anaerob gären können. So besteht durchaus die Möglichkeit, daß methanogene Bakterien ein physiologischer Bestandteil dieser Darmflora werden können, wie Versuche an menschlichen Freiwilligen zeigen. Dabei konnte, wie bereits von Bond et al. (1971) beschrieben, zwischen zwei Gruppen von Probanden unterschieden werden. Die erste Gruppe war nicht besiedelt und die Methankonzentration ihrer Atemluft lag im Bereich der Raumluft. Dies ist dahingehend zu deuten, daß inhaliertes

Methan ohne metabolische Veränderung im Organismus wieder ausgeatmet wird. Die zweite Gruppe konnte als mit methanogenen Bakterien besiedelt identifiziert werden (Abb. 3.31.) Bei diesen Probanden wird das im Darm gebildete Methan als lipophile Substanz sofort resorbiert, mit Hilfe des Blutes zur Lunge transportiert und dort abgeatmet, wobei in der endexpiratorischen Atemluft hohe Methankonzentrationen auftreten können.

Methan ist die am meisten reduzierte organische Substanz, und Methanbildung ist der terminale Schritt in der Nahrungskette fermentativer Mikroorganismen (Gottschalk, 1979). Methanogene Bakterien sind strikte Anaerobier, die Kohlendioxyd und Wasserstoff zu Methan umsetzen. Sie sind mit den meisten Prokaryonten nur wenig verwandt, wie Vergleiche der Basensequenzen der ribosomalen RNS ergeben haben. Der Befund, daß ihre Zellwand kein Murein enthält und die Cytoplasmamembran keine Fettsäuretriglyceride, sondern Isoprenoidlipide, rechtfertigt die Annahme, daß sich dieser Bakterientyp schon früh in der Evolution von den anderen Prokaryonten abgezweigt hat (Thauer und Fuchs, 1979).

Ob die Besiedlung der Versuchstiere einen physiologischen Vorgang darstellt, oder ob dadurch ein schädigender Einfluß ausgeübt wird, kann durch die vorliegenden Befunde nicht abschließend geklärt werden. Das Auftreten von methanogenen Bakterien auch in der Darmflora von gesunden menschlichen Freiwilligen läßt eher auf einen harmlosen Prozeß schließen. Trotzdem muß der mikrobiellen Besiedlung von Versuchstieren Beachtung geschenkt werden, denn Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen können, wie zum Beispiel das von Proteus-Arten gebildete Neurotoxin Methylmercaptan (Hayward und Jeavons, 1978), die Versuchsergebnisse erheblich beeinflussen.
Aus Cancerisierungsexperimenten mit Mäusen zum Beispiel ist bekannt, daß die Incidenz der auftretenden Tumoren von der Anwesenheit von Mikroorganismen abhängt. So konnten Schrei-

ber und Nettesheim (1972) eine höhere Zahl von Lungentumoren bei den Tieren nachweisen, die eine Infektion des Respirationstraktes aufwiesen, als bei denen, die allein das Carcinogen N-Nitrosoheptamethylenimin erhalten hatten. Muzutoni und Mitsuoka (1979) fanden bei weitestgehend keimfreien Tieren (Gnotobioten) die geringste Zahl von Lebertumoren, während SPF-Tiere (specified pathogen free) eine höhere und konventionelle Mäuse, deren mikrobieller Status unbekannt war, die höchste Inzidenz aufwiesen.

5.5. Abschließende Bemerkungen

Zur Klärung der Ätiologie des alkoholischen Leberschadens kann die vorliegende Arbeit keine großen Beiträge leisten. Es konnte lediglich die Hypothese widerlegt werden, daß Lipidperoxidation am Ethanoleffekt beteiligt ist. Einen neuen Aspekt ergab dagegen die bei den Versuchen beobachtete Methanabatmung. Sie ist ein Anzeichen dafür, daß sich unter chronischer Ethanolbelastung das Spektrum der Anaerobier im Gastrointestinaltrakt der Versuchstiere verändert hat.

Für eine direkte Leberschädigung gibt es bisher kein Tiermodell. Inwieweit die Befunde, die Lieber an chronisch Ethanol trinkenden Primaten erhoben hat, die Ätiologie des beim Menschen auftretenden Leberschadens nach Ethnolabusus repräsentieren, ist bislang noch offen. Daher besteht der Verdacht, daß Ethanol nicht allein und direkt hepatotoxisch wirkt und zu Hepatitis mit nachfolgender Zirrhose führt, sondern daß andere, zur Zeit noch unbekannte Toxine dabei eine wichtige Rolle spielen. Es ist durchaus möglich, daß sie aus der intestinalen Bakterienflora stammen. Die Beobachtung der Besiedlung des Darmes mit methanogenen Bakterien bietet dafür einen Hinweis. Diese Besiedlung ist wahrscheinlich ein Ausdruck für die erhebliche Schädigung der Darmmucosa durch Ethanol. Es wird immer wieder vergessen, daß selbst beim Menschen 10 mal höhere Ethanolkonzentrationen in der Duodenalflüssigkeit als im Blut gemessen wurden.

Ein weiteres Argument für die Beteiligung unbekannter Toxine ist die Tatsache, daß in der Humanpathologie Krankheitsbilder bekannt sind, die von der Ethanol-bedingten Leberschädigung nicht zu unterscheiden sind, z.B. die akute Hepatitis mit nachfolgendem zirrhotischen Umbau der Leber nach intestinalen Bypass-Operationen.

Literatur

1 H.P.T. Ammon, C.-J. Estler und F. Heim
Biochem. Pharmacol. 18, 29-35 (1969)

2 T. Ariyoshi, E. Takabatake und H. Remmer
Life Sci. 9, 361-369 (1970)

3 C. Auclair, D. de Prost und J. Hakim
Biochem. Pharmacol. 27, 355-358 (1978)

4 H. Baur
Diplomarbeit, Tübingen, 1972

5 H. Baur, S. Kasparek und E. Pfaff
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 827-838 (1975)

6 C. Beauchamp und J. Fridovich
J. Biol. Chem. 245, 4641-4646 (1970)

7 A. Benedetti, A.F. Casini, M. Ferrali und M. Comporti
Chem.-Biol. Interactions 17, 151-166 (1977a)

8 A. Benedetti, A.F. Casini, M. Ferrali und M. Comporti
Chem.-Biol. Interactions 17, 167-183 (1977b)

9 A. Benedetti, A.P. Casini, M. Ferrali und M. Comporti
Exp. Mol. Pathol. 27, 309-323 (1977c)

10 H.U. Bergmeyer und E. Bernt
In H.U. Bergmeyer (Hrsg) Methoden der enzymatischen Analyse, Weinheim, (1974)

11 J. Bernstein, L. Videla und Y. Israel
Biochem. J. 134, 515-521 (1973)

12 M. Berry und D.S. Friend
J. Cell Biol. 43, 506-520 (1969)

13 C.H. Best, W.S. Hartroft, C.C. Lucas und J.H. Ridout
Brit. Med. J. 2, 1001-1006 (1949)

14 A. Bini, G. Vecci, G. Vivoli, V. Vannini und C. Cessi
Pharmacol. Res. Commun. 7, 143-149 (1975)

15 H.M. Bolt, H. Kappus, A. Buchter und W. Bolt
Arch. Toxicol. 35, 153-162 (1976)

16 J. Bond, R. Engel und M. Levitt
J. Exptl. Med. 133, 572-588 (1971)

17 U. Breyer-Pfaff, Inst. f. Toxikologie, Tübingen
persönliche Mitteilung (1979)

18 J. Bunyan, M.A. Cawthorne und A.T. Diplock
Br. J. Nutr. 23, 309-314 (1969)

19 R.T. Burk, M.J. Trumble und R.A. Lawrence
Biochem. Biophys. Acta 618, 35-41 (1980)

20 Th. Butler
J. Pharmacol. Exp. Ther. 134, 311-319 (1961)

21 J.A. Castro und M.J. Diaz Gomez
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 541-552 (1972)

22 A.J. Cederbaum, E. Dicker, C.S. Lieber und E. Rubin
Biochem. Pharmacol. 27, 7-15 (1978)

23 M. Comporti, C. Saccocci und M.U. Dianzani
Enzymologie 29, 185-204 (1965)

24 M. Comporti, A. Hartman und N.R. DiLuzio
Laboratory Invest. 16, 616-624 (1967)

25 M. Comporti, E. Burdino und F. Raja
Life Sci. 10, 855-866 (1971)

26 M. Comporti, A. Benedetti und E. Chieli
Lipids 8, 498-502 (1973)

27 A.H. Conney und A.G. Gilman
J. Biol. Chem. 238, 3682-3685 (1963)

28 A.H. Conney
Pharmacol. Rev. 19, 317-366 (1967)

29 H. Coper
in: W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Mannheim (1980)

30 N. Cornell, W. Lund und H. Krebs
Biochem. J. 142, 327-337 (1974)

31 H.H. Cornish
In: J. Doull, C.D. Klaasen und M.O. Amdur (Hrsg.)
Toxicology, New York (1980)

32 J.E. Downey, D.H. Irving und Al L. Tappel
Lipids 13, 403-407 (1978)

33 M.E. Dean und B.H. Stock
Toxicol. Appl. Pharmacol. 28, 44-52 (1974)

34 R.A. Deitrich, P.A. Troxell und V.G. Erwin
Arch. Biochem. Biophys. 166, 543-548 (1975)

35 R.A. Deitrich und D.R. Petersen
In: E. Majchrowicz und E.P. Noble (Hrsg.) Biochemistry
and Pharmacology of ethanol. Vol. 2, New York (1979)

36 D. Diembiec, D. MacNamee und G. Cohen
J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 332-339 (1976)

37 M.J. Diaz Gomez und J.A. Castro
Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 199-206 (1980)

38 C.J. Dillard, E.E. Dumelin und Al L. Tappel
Lipids 12, 109-114 (1977)

39 C.J. Dillard, R.E. Litov und Al L. Tappel
Lipids 13, 396-402 (1978)

40 N.R. DiLuzio
Am. J. Physiol. 194, 453-456 (1964)

41 N.R. DiLuzio
Laboratory Invest. 15, 50-63 (1966)

42 N.R. Diluzio und A.D. Hartman
Federation Proc. 26, 1436-1442 (1967)

43 N.R. DiLuzio und A.D. Hartman
Exp. Mol. Pathol. 11, 38-52 (1969)

44 N.R. DiLuzio
Federation Proc. 32, 1875-1881 (1973)

45 D.H. Donavan und D.B. Menzel
Experientia 34, 775-776 (1978)

46 J. Dow und A. Goldberg
Biochem. Pharmacol. 24, 863-866 (1975)

47 E.F. Dumelin und Al L. Tappel
Lipids 12, 894-900 (1977)

48 J. Ellingboe und G.C. Varanelli
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 24,
87-102 (1979)

49 P. Eriksson
Biochem. Pharmacol. 26, 249-252 (1977)

50 L. Feinman und C.S. Lieber
Science 176, 795-797 (1972)

51 W. Feuerlein
Unfall- und Sicherheitsforschung Straßenverkehr,
Heft 10, 109-120 (1977)

52 J. Filser
Dissertation, Tübingen (1979)

53 J.G. Filser und H.M. Bolt
Arch. Toxicol 42, 123-136 (1979)

54 R.G. Flower
Pharmacol. Rev. 26, 33-67 (1974)

55 H. Frank, T. Hintze und H. Remmer
in: B. Kolb (Hrsg.) Applied headspace gas chromatography
London (1980a)

56 H. Frank, T. Hintze, D. Bimboes und H. Remmer
Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 337-344 (1980b)

57 E. Frankel, J. Navakowska und C. Evans
J. Am. Oil Chem. Soc. 38, 161-162 (1961)

58 U. Frommer, V. Ullrich und H. Staudinger
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 903-912 (1970)

59 J.S. Galaver, D.H. Van Thiel und R. Lester
Alcoholism 4, 271-276 (1980)

60 C.H. Gallagher
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40, 241-245 (1962)

61 E. Gladtke und H. v. Hattingenberg
Pharmacokinetics, New York (1979)

62 E.Glende
Biochem. Pharmacol. 21, 1697-1702 (1972)

63 E. Glende, A. Hruszkewycz und R.O. Recknagel
Biochem. Pharmacol. 25, 2163-2170 (1976)

64 C.L. Gomez-Dumm, E.A. Porta, W.S. Hartroft und O.R. Koch
Laboratory Invest. 18, 365-378 (1968)

65 E.R. Gordon und J. Lough
Laboratory Invest. 26, 154-162 (1972)

66 G. Gottschalk
Bacterical metabolism. New York (1979)

67 N.J. Greenfield, R. Pietruszko, G. Lin und D. Lester
Biochem. Biophys. Acta 428, 627-632 (1976)

68 H. Greim und H. Remmer
Arch. Pharmacol. Exptl. Pathol. 251, 110-117 (1965)

69 H. Greim, J.B. Schenkman, M. Klotzbücher und H. Remmer
Biochem. Biophys. Acta 201, 20-28 (1970)

70 P.A. Goodman und J.F. Meany
Biochemistry 13, 3254-3257 (1974)

71 N. Grunnet, B. Quistorff und H. Thieden
Eur. J. Biochem. 40, 275-282 (1973)

72 D. Hafeman und W. Hoekstra
J. Nutr. 107, 656-665 (1977)

73 T. Haley
Drug Metabolism Reviews 9, 319-335 (1979)

74 W.S. Hartroft, E.A. Porta und H. Suzuki
J. Stud. Alc. 25, 427-437 (1964)

75 Y. Hasamura, R.Teschke und C.S. Lieber
Science 189, 727-729 (1975)

76 J. Haselbach
Dissertation, Tübingen (1980)

77 S. Hashimoto und R,O. Recknagel
Exp. Mol. Pathol. 8, 225-242 (1968)

78 D.A. Haugen, Th. van der Hoeven und M.J. Coon
J. Biol. Chem. 250, 3567-3570 (1975)

79 W.J. Hayes
Toxicology of pesticides. Baltimore (1975)

80 N.J. Hayword und T.H. Jeavons
J. Clin. Microbiol. 6 , 202-208 (1978)

81 N. Heni und H. Remmer
Arch. Toxicol. 28, 1-11 (1971)

82 H. Held
Digestion 15, 136-146 (1977)

83 A.G. Hildebrandt
in: G.S. Boyd und R.M.S. Smellie (Hrsg.) Biological Hydroxylation mechanisms. New York (1972)

84 A.G. Hildebrandt, M. Speck und I. Roots
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 968-975 (1973)

85 P.J. Hissin und R. Hilf
Anal. Biochem 74, 214-226 (1976)

86 P. Hochstein und L. Ernster
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 388-394 (1963)

87 J. Högberg, A. Bergstrand und S.V. Jakobson
Eur. J. Biochem. 37, 51-59 (1973)

88 J. Högberg, S. Orrenius und P.J. O'Brien
Eur. J. Biochem. 59, 449-455 (1975a)

89 J. Högberg, P. Moldeus, B. Arborgh, P.J. O'Brien und S. Orrenius, Eur. J. Biochem. 59, 457-462 (1975b)

90 J. Högberg, S. Orrenius und R.E. Larson
Eur. J. Biochem. 50, 595-602 (1975c)

91 J. Högberg und A. Kristopherson
Fur. J. Biochem. 74, 77-82 (1977

92 W.G. Hoekstra
Federation Proc. 34, 2083-2089 (1975)

93 M.G. Horning, M.J. Earle und H.M. Haling
Biochim. Biophys. Acta 56, 175-177 (1962)

94 R.J. Horvat, W.G. Lane, H. Ng und A.D. Sheperd
Nature 203, 523-524 (1964)

95 E.L. Hove
Arch. Biochem. 17, 467-473 (1948)

96 J. Huerga und H. Popper
J. Clin. Invest. 31, 598-603 (1952)

97 D. Hultmark, K. Sundh, L. Johansson und E. Arrhenius
Biochem. Pharmacol. 28, 1587-1590 (1979)

98 R.E. Hungate
Ann. Rev. Ecol. Systems 6, 39-66 (1975)

99 E.W. Hurst
In: A.L. Walpole und A. Spinks (Hrsg.). The evaluation of drug toxicity. Boston (1958)

100 IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans: Some halogenated hydrocarbons. Band 20, Lyon (1979)

101 P. Jenner und B. Testa
Xenobiotica 8, 1-25 (1978)

102 K.L. Jones, C.N. Ulleland und A.P. Streissguth
Lancet 1:1267-1271 (1973)

103 O.A. Iseri, C.S. Lieber und L.S. Gottlieb
Am. J. Pathol. 48, 535-555 (1966)

104 Y. Israel, L. Videla und J. Bernstein
Federation Proc. 34, 2052-2059 (1975)

105 K. Isselbacher
N. Engl. J. Med. 296, 612-616 (1977)

106 J. Kaltenbach, M. Kaltenbach und W.B. Lyons
Exptl. Cell Res. 15, 112-119 (1958)

107 E.W. Kelloq und J. Fridovich
J. Biol. Chem. 250, 8812-8817 (1975)

108 G. Kessler
Diplomarbeit, Tübingen (1980)

109 H. Kieczka und H. Kappus
Toxicol. Lett. 5, 191-196 (1980)

110 C.D. Klaasen
in: J. Doull, C.D. Klaasen und M.O. Amdur (Hrsg.)
Toxicology, New York (1980)

111 O.R. Koch, F.A. Porta und W.S. Hartroft
Laboratory Invest. 18, 379-386 (1968)

112 R.R. Koch, E.A. Glende und R.O. Recknagel
Biochem. Pharmacol. 23, 2907-2915 (1974)

113 U.Köster, D. Albrecht und H. Kappus
Toxicol. Appl. Pharmacl. 41, 639-648 (1977)

114 D.Köster-Albreht, H. Kappus und H. Remmer
Toxicol. Appl. Pharmacol. 46, 499-505 (1978)

115 M.A. Korsten, S. Matsuzaki, L. Feinman und C.S. Lieber
N. Engl. J. Med. 292, 386-389 (1975)

116 N.S. Kosower und E.M. Kosower
in: W.A. Pryor (Hrsg.) Free radicals in biology. Band 2
New York (1976)

117 H. Krebs, R. Hems und B. Tyler
Biochem. J. 158, 341-353 (1976)

118 C.M. Leevy, T. Chen und R. Zetterman
Ann. N.Y. Acad. Sci. 252, 106-115 (1975)

119 D. Lester
J. Stud. Alc. 22, 554-573 (1961)

120 W. Levin, A. Lu, M. Jacobson, R. Kuntzman, J. Poye und P. McCay
Arch. Biochem. Biophys. 158, 842-852 (1973)

121 C.S. Lieber
Gastroenterology 59, 930-937 (1970)

122 C.S. Lieber und L.M. DeCarli
J. Biol. Chem. 245, 2505-2512 (1970)

123 C.S. Lieber und L.M. DeCarli
Drug Metabolism and Disposition 1, 428-440 (1973)

124 C.S. Lieber, R. Teschke, Y, Hasumura und L.M. DeCarli
Federation Proc. 34, 2060-2074 (1975)

125 C.S. Lieber und L.M. DeCarli
Federation Proc. 35, 1232-1236 (1975)

126 C.S. Lieber
Seminars in Hematology 17, 85-99 (1980)

127 C.S. Lieber und L.M. DeCarli
Science 162, 917-918 (1968)

128 M. Lieberman und L.W. Mapson
Nature 204, 343 (1964)

129 M. Lieberman, A.T. Kunishi, L.W. Mapson und D.A. Wardale
Biochem. J. 97, 449- 459 (1965)

130 M. Lieberman und P. Hochstein
Science 152, 213-214 (1966)

131 T.D. Lindström, M.W. Anders und H. Remmer
Exp. Mol. Pathol. 28, 48-57 (1978)

133 R.E. Litov, D.H. Irving, J.F. Downey und A.L. Tappel
Lipids 13, 305-307 (1978)

134 M.K. Logani und R.E. Davies
Lipids 15, 485-495 (1980)

135 O.H. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr und R. Randall
J. Biol. Chem. 192, 265-275 (1951)

136 A.H. Lu
Drug Metabolism Reviews 10, 187-208 (1979)

137 L. Lumper, H.J. Plock und H. Staudinger
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1185-1190 (1968)

138 H.R. Mahler und E.H. Cordes
Biological Chemistry. New York (1966)

139 H. Maling, B. Stripp, J. Sipes, B. Highman, W. Saul und W. Williams
Toxicol. Appl. Pharmacol. 33, 291-308 (1975)

140 S. Mallov und J. Bloch
Am. J. Physiol. 184, 29-34 (1956)

141 Y. Matsuda, E. Baraona und M. Salaspuro
Laboratory Invest. 41, 455-463 (1979)

142 S. Matsuzaki und C.S. Lieber
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 1059-1065 (1977)

143 P. McCay, J. Poyer, P. Pfeifer, H. May und J. Gillan
Lipids 6, 297-306 (1970)

144 C.M. MacDonald
FEBS Lett. 35, 227-230 (1973)

145 F. Marks und E. Hecker
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 727-729 (1967)

146 J.G. Meyer-Bertrath
Enzymdiagnostik. Marburg (1976)

147 E. Mezwy und F. Tobon
Gastroenterology 61, 707-715 (1971)

148 L.L. Miller, C.G. Bly, M.L. Watson und W.F. Bale
J. Exp. Med. 94, 431-453 (1951)

149 P.S. Misra, A. Lefevre, H. Ishii, E.Rubin und C.S. Lieber
Am. J. Med. 51, 346-351 (1971)

150 J.R. Mitchell, W.Z. Potter, J.A. Hinson und W.R. Snodgrass in: O. Eichler, A. Farah, H. Herken und A.D. Welch (Hrsg.)
Handbuch der experimentellen Pharmakologie. New York (1978)

151 P. Moldeus
Biochem. Pharmacol. 27, 2859-2863 (1978)

152 J. Morland, A. Bessesen und L. Svendsen
Alcoholism 4, 313-321 (1980)

153 F.H. Mukai und H. Goldstein
Science 191, 868-869 (1976)

154 T. Muzutoni und T. Mitsuoka
J. Natl. Cancer Inst. 63, 1364-1370 (1979)

155 R.D. Myers und C.L. Melchior
Science 196, 554-556 (1977)

156 H. Nagasawa, D. Goon, E. DeMaster und C. Alexander
Life Sci. 20, 187-194 (1977)

157 T. Nakamura und J. Hishinuma
in: C. deDuve und O. Hayaishi (Hrsg.)
Tocopherol, oxygen and biomembranes. Amsterdam (1978)

158 W. Nastainczyk, V. Ullrich und H. Sies
Biochem. Pharmacol. 27, 387-392 (1978)

159 R.A. Neal
in: J. Doull, C.D. Klaasen und M.O, Amdur (Hrsg.)
Toxicology. New York (1980)

160 A. Neill, D. Grime und R. Dawson
Biochem. J. 170 , 529-535 (1978)

161 G.D. Nordblom, R.E. White und M.J. Coon
Arch. Biochem. Biophys. 175, 524-533 (1976)

162 G. Obe, H. Ristow und J. Herka
in: M.M. Gross (Hrsg.) Alcohol intoxication and withdrawal. New York (1977)

163 K. Okamura, T.R. Harwood und H. Yokoo
Lab. Invest. 33, 191-199 (1975)

164 H. Orrego und Y. Israel
in: R.G. Thurman (Hrsg.) Alcohol and aldehyde metabolizing systems. Band 4, New York 1980

165 N. Oshino, R. Oshino und C. Chance
Biochem. J. 131, 555-567 (1973)

166 A. Pannatier, P. Jenner, B. Testa und J.C. Etter
Drug Metabolism Reviews 8, 319-343 (1978)

167 M. Pesh-Imam und R.O. Recknagel
Toxicol. Appl. Pharmacol. 42, 463-475 (1977)

168 R.E. Pinto und W. Bartley
Biochem. J. 115, 449-456 (1969b)

170 G.L. Plaa, G.J. Traiger, G.K. Hansono und H.P. Witschi
in: J.M. Khanna, Y. Israel und H. Halant (Hrsg.) Alcoholic liver pathology. Toronto (1975)

171 G.L. Plaa und H.P. Witschi
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 125-141 (1976)

172 C.F. Olson und R.N. Tattersale
Clinical toxicology. London (1969)

173 E.A. Porta und C.L. Gomez-Dumm
Laboratory Invest. 18, 352-364 (1968)

174 W.A. Pryor
in: W.A. Pryor (Hrsg.) Free radicals in biology. Band 1
New York (1976)

175 A.D. Rahimtula und P.J. O'Brien
Eur. J. Biochem. 77, 201-208 (1977)

176 N.H. Raskin
N. Engl. J. Med 292, 422-423 (1975)

177 R.O.Recknagel und A.K. Goshal
Exp. Mol. Pathol. 5, 413-426 (1966a)

178 R.O. Recknagel und A,K. Goshal
Laboratory Invest. 15, 132-148 (1966b)

179 R.O. Recknagel und A.K. Goshal
Exp. Mol. Pathol. 5, 108-117 (1966c)

180 R.O. Recknagel
Pharmacol. Rev. 19, 145-208 (1967)

181 R.O. Recknagel und Y. Turocy
Exp. Mol. Pathol. 27, 93-105 (1977)

182 R.O. Recknagel, E. Glende und A.M. Hruszkewycz
in: W.A. Pryor (Hrsg.) Free radicals in biology.
Band 3, New York (1977)

183 O. Reiner, S. Athanassopoulos, K. Hellmer, R. Murray
und H. Uehleke
Arch. Toxicol. 29, 219-233 (1972)

184 R.C. Reitz, E. Helsabeck und D.P. Mason
Lipids 8, 80-84 (1973)

185 R.C. Reitz
Biochem. Biophys. Acta 380, 145-154 (1975)

186 H. Remmer, H. Greim, J.B. Schenkman und R.W. Eastabrok
Methods Enzymol. 10, 703-708 (1967)

187 H. Remmer, D. Albrecht und H. Kappus
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298, 107-113
(1977)

188 E.S. Reynolds und A.G. Yee
Laboratory Invest. 16, 591-603 (1967)

189 E.S. Reynolds und M. Moslen
Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, 377-388 (1974)

190 C.A. Riely, G. Cohen und M.Lieberman
Science 183, 208-210 (1974)

191 F.L. Rodkey und H.A. Collison
Toxicol. Appl. Pharmacol. 40, 39-47 (1977)

192 R. Rognstad und H. Grunnet
in: E. Majchrowicz und E.P. Noble (Hrsg.) Biochemistry
and pharmacology of ethanol. Band 1, New York (1979)

193 E. Rubin, F. Hutterer und C.S. Lieber
Science 159, 1469-1470

194 E. Rubin und C.S. Lieber
N. Engl. J. Med. 278, 863-876 (1968)

195 E. Rubin, C.S. Lieber, K. Altman, G. Gordon und A. Southren
Science 191, 563-564 (1976)

196 E. Rubin, P. Bacchin, H. Gang und C.S. Lieber
Laboratory Invest. 22, 569-580 (1976)

197 M. Sagai und Al L. Tappel
Toxicol. Lett. 2, 149-155 (1978)

198 M. Sagai und Al L. Tappel
Toxicol. Appl. Pharmacol. 49, 283-291 (1979)

199 C.P. Sieger, J.G. Filser und H.M. Bolt
Toxicol. Appl. Pharmacol. 46, 709-716 (1978)

200 M. Siegert, B. Alsleben, W. Liebenschütz und H.Remmer
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. und Pharmacol. 247, 509-521 (1964)

201 H. Sies
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1021-1032 (1977)

202 T.F. Slater
Nature 209, 36-40 (1966)

203 T.F. Slater und B.L. Sawyer
Biochem. J. 123, 805-814 (1971)

204 T.F. Slater
Free radical mechanisms in tissue injury. London (1972)

205 T.F. Slater
In: J.W. Gorrod (Hrsg.) Drug toxicity. London (1979)

206 E.A. Smuckler, E. Arrhenius und T. Hultin
Biochem. J. 103, 55-64 (1967)

207 E.A. Smuckler
Federation Proc. 34, 2038-2044 (1975)

208 R. Scheig und G. Klatskin
Life Sci. 8, 855-865 (1969)

209 E. Schmidt
in: H.U. Bergmeyer (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim (1974)

210 R. Scholz und H. Nohl
Eur. J. Biochem. 63, 449-458 (1976)

211 H. Schreiber und P. Hettesheim
J. Natl. Cancer Inst. 49, 1107-1114 (1972)

212 R. Schüppel
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 265, 156-169 (1969)

213 N. Stacey und B. Priestly
Toxicol. Appl. Pharmacol. 45, 41-48 (1978)

214 T.E. Stege, J.D. Hanby und N.R. DiLuzio
in: F.A. Seixas (Hrsg.) Currents in alcoholism. New York (1977)

215 F.B. Stifel, H.L. Greene, E. Lufkin, M. Wrench, L. Hagler und R. Herman
Biochim. Biophys. Acta 428, 633-638 (1976)

216 J. Strömme
Biochem. Pharmacol. 14, 393-410 (1965)

217 O. Strubelt und M. Völpel
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302 (Suppl) R 19 (1978)

218 A. Takada, F. Ikegami, Y. Okumura, Y. Hasumura, R. Kanayama und J. Takeuchi
Laboratory Invest. 23, 421-428 (1970)

219 J. Takeuchi, A. Takada, R. Kanayama, N. Ohara und Y. Okumura
Laboratory Invest. 21, 398-405 (1969)

220 Al L. Tappel
Federation Proc. 24, 73-78 (1965)

221 Al. L. Tappel
Federation Proc. 32, 1870-1874 (1973)

222 A.L. Tappel
in: W.A. Pryor (Hrsg.) Free radicals in biology. Band 4
New York (1980)

223 N. Tateishi, T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse und
Y. Sakamoto
J. Biochem. 75, 93-103 (1974)

224 B. Testa und P. Jenner
Drug Metabolism Reviews 7, 325-309 (1978)

225 R. Thauer und G. Fuchs
Naturwissenschaften 66, 89-94 (1979)

226 R. Thauer, Institut für Biochemie, Marburg
persönliche Mitteilung 1979

227 H. Theorell und R. Bonnichsen
Acta Chem. Scand. 5, 1105-1126

228 L. Thomas
Labor und Diagnose. Marburg (1978)

229 R.G. Thurman und W. McKenna
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 336-340 (1974)

230 R.G. Thurman, W. McKenna, H.J. Brentzel und S. Hesse
Federation Proc. 34, 2075-2081 (1975)

231 R.G. Thurman und R. Scholz
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1443-1446 (1976)

232 B.F. Trump und J.L.E. Eriesson
in: B.W. Zweifach, L. Grant und R.T. McCluskey (Hrsg.)
Liver pathology. New York (1965)

233 Prof. Dr. Überberg, Thomae, Biberach
persönliche Mitteilung (1979)

234 H. Uehleke, K.H. Hellmer und S. Tabarelli
Xenobiotica 3, 1-11 (1973)

235 V. Ullrich, P. Weber und P. Wollenberg
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 808-813 (1975)

236 A. Valenzuela, H. Fernandez, G. Ugarte und L.A. Videla
FEBS Lett. 111, 11-13 (1980)

237 L.A. Videla, J. Bernstein und Y. Israel
Biochem. J. 134, 507-514 (1973)

238 L.A. Videla, V. Fernandez, G. Ugarte und A. Valenzuela
FEBS Lett. 111, 6-10 (1980)

239 J. Vina, R. Hems und H.A. Krebs
Biochem. J. 170, 627-630 (1978)

240 J. Vina, J.M. Estrela, C. Guerri und F.J. Romero
Biochem. J. 188, 949-552 (1980a)

241 J.P. v. Wartburg, J. Bethune und B. Ballee
Biochemistry 3, 1775-1782 (1964)

242 C.C. Weddle, K.R. Hornbrock und P.B. McCay
J. Biol. Chem. 251, 4973-4978 (1976)

243 F.J. Wiebel, J.C. Leutz, L. Diamond und H.V. Gelboin
Arch. Biochem. Biophys. 144, 78-86 (1971)

244 R.J. Willis, M. Pesh-Immam und R.O. Recknagel
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 18, 433-437 (1977)

245 Z.T. Wirtschafter und M.W. Cronyn
Arch. Environm. Health 9, 186-191 (1964)

246 L.A. Witting
in: W.A. Pryor (Hrsg.) Free radicals in biology. Band 4
New York (1980)

247 A. Wendel, S. Feuerstein und K.H. Konz
Biochem. Pharmacol. 28, 2051-2055 (1979)

Lebenslauf

Am 16.10.1948 wurde ich als Sohn des Dr. med. Gerhard Hintze und seiner Ehefrau Eleonore, geb. Köpp in Holzminden an der Weser geboren. Von Ostern 1955 bis 1959 besuchte ich dort die Volksschule für Knaben. Danach wechselte ich zum Gymnasium für Jungen in Holzminden. Von Sommer 1965 bis Sommer 1966 besuchte ich als Austauschschüler die Hillsdale High School in San Mateo, Kalifornien, USA. Im Sommer 1967 legte ich am Gymnasium für Jungen in Holzminden die Reifeprüfung ab. Zum Wintersemester 1967/68 begann ich mit dem Studium der Biochemie in Tübingen. Im Herbst 1974 legte ich die mündliche Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Organische Chemie und Pharmakologie ab. Anschließend arbeitete ich am Pharmakologischen Institut unter Prof. Dr. H. Uehleke an meiner Diplomarbeit "Irreversible Bindung von 14-C-markiertem Phenacetin und Paracetamol an Makromoleküle der Leber in vivo und in vitro", die im Januar 1976 abgeschlossen wurde. Danach trat ich in das Toxikologische Institut ein und arbeitete unter Prof. Dr. H. Remmer zunächst an Problemen der veränderten katalytischen Aktivität derivatisierter Enzyme sowie der Proteinbeladung von wiederversiegelten Erythrozytenghosts. Im Januar 1977 begannen die Versuche zur vorliegenden Doktorarbeit "Einfluß akuter und chronischer Ethanolbehandlung auf die Lipidperoxidation in vivo und in vitro", die im Dezember 1979 beendet wurden. Seit Januar 1980 nehme ich an dem vom Verband der Chemischen Industrie (VCI) ins Leben gerufenen "Fortbildungskurs in Toxikologie für Chemiker" in Tübingen und Neuherberg teil.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:
Bayer, Betz, Feine, Flohé, Krell, Guglielmi, Kallee, Kortüm, Krüger, Mauser Metzner, Möhres, Mörike, E. Müller, Pape, Probst, Remmer, Schwartz, Schweizer, Siess, Rüdorff, Weitzel, Weber, Wegmann, Wendel, Weser, Zähner.